

Aus der Medizinischen Klinik m.S. Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Das Zytoskelett der Endothelzelle:
Bedeutung des Mikrotubulus- und
Mikrofilamentsystems
für die Regulation der
Endothelpermeabilität**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Hans-Werner Mühle
aus Bochum

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
2. Prof. Dr. med. H.-J. Schnittler
3. Prof. Dr. med. vet., PhD H. Augustin

Datum der Promotion: 16.01.2004

Liste der verwendeten Abkürzungen

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cytochalasin D
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
F-Aktin	Filamentäres (polymerisiertes) Aktin
G-Aktin	Monomeres Aktin
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GTP	Guanintriphosphat
HBSS +/-	Hank's buffered salt solution, mit Kalzium und Magnesium
HBSS -/-	Hank's buffered salt solution, ohne Kalzium und Magnesium
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N ₂ -Hydroxyethyl-Piperazin-N ₂ -Ethansulfonsäure
HNE	Humane neutrophile Elastase
LDH	Laktatdehydrogenase
M 199	Medium 199
MaP	Mikrotubulus assoziiertes Protein
MF	Mikrofilament = F-Aktin
MT	Mikrotubulus
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
PAEC	Pulmonale Arterienendothelzellen
PEEP	Positive endexpiratory pressure
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMA	Phorbol-12-Myrisat-13-Acetat
SB1	Salt buffer 1
SB2	Salt buffer2
T 75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Bodenfläche
TRITC	Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Akute Respiratorische Distress-Syndrom (ARDS).....	1
1.2	Pulmonale Endothelzellen.....	2
1.3	Das Aktinfilamentsystem.....	3
1.3.1	Aufbau des Aktinfilamentsystems.....	4
1.3.2	F-Aktin-assoziierte Proteine.....	5
1.3.3	Funktion des F-Aktin-Systems.....	6
1.3.3.1	Zellkortex und Mikrofilamente.....	6
1.3.3.2	Junktionale F-Aktin-Verbindungen.....	7
1.3.3.3	Mikrofilamentäre Stressfasern.....	7
1.4	Das Mikrotubulussystem der Zelle.....	8
1.4.1	Aufbau des Mikrotubulussystems.....	8
1.4.2	Mikrotubulus-assoziierte Proteine.....	12
1.4.3	Funktion des Mikrotubulussystems.....	13
1.5	Interaktionen von Mikrotubulus- und Aktinfilament-Systemen.....	15
1.6	Endothel-Permeabilität.....	17
1.6.1	In vitro-Modell zur Messung endothelialer Permeabilität.....	18
1.7	Toxine, die in die Regulation des Mikrotubulus-Systems eingreifen.....	19
1.7.1	Colchicin.....	19
1.7.2	Vinca-Alkaloide.....	20
1.7.3	Paclitaxel.....	21
1.8	Toxine mit direkter oder indirekter Wirkung auf das endotheliale Zytoskelett.....	21
1.8.1	Cytochalasin D.....	22

II

1.8.2	Toxin B von <i>Clostridium difficile</i>	22
1.8.3	<i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin.....	22
1.8.4	Granulozytäre Wirkstoffe.....	23
1.8.4.1	Wasserstoffperoxid (H_2O_2).....	24
1.8.4.2	Humane neutrophile Elastase (HNE).....	24
1.9	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	25
2.	Methodik und Material.....	26
2.1	Isolation und Kultivierung pulmonalarterieller Endothelzellen des Schweins.....	26
2.2	Quantifizierung der endothelialen Permeabilität.....	27
2.2.1	Vorbereiten der Polycarbonatfiltermembranen.....	27
2.2.2	Bepflanzen der Filtermembranen mit Endothelzellen.....	28
2.2.3	Messung der endothelialen Permeabilität.....	29
2.2.4	Versuchsprotokoll für Permeabilitätsmessung.....	30
2.2.5	Berechnung der hydraulischen Konduktivität.....	31
2.3	Untersuchung der Morphologie von pulmonalarteriellen Endothelzellen.....	32
2.3.1	Bepflanzen von Glass-Chamber-Slides mit Endothelzellen.....	32
2.3.2	Doppelimmunfluoreszenz: Untersuchung des Mikrotubulus- und Aktinfilament-Systems pulmonalarterieller Endothelzellen.....	33
2.3.2.1	Methodische Grundlagen.....	33
2.3.2.2	Versuchsdurchführung.....	33
2.3.2.3	Filme und Fotos.....	34
2.4	Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin.....	35
2.4.1	Methodische Grundlagen.....	35
2.4.2	Versuchsdurchführung.....	35
2.4.3	Bestimmung des Zellproteins.....	36
2.5	Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN).....	37
2.5.1	Stimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten.....	38

2.6	Material.....	38
2.6.1	Kulturmedien und Pufferlösungen.....	38
2.6.2	Toxine.....	39
2.6.3	Antikörper und fluoreszierende Substanzen.....	40
2.6.4	Sonstige Reagenzien.....	41
2.6.5	Zubehör.....	41
2.6.6	Geräte.....	41
2.7	Statistik.....	42
3.	Ergebnisse.....	43
3.1	Morphologie von Mikrotubulus-, Aktin- und Intermediär- filamenten in unstimulierten Endothelzellen (Kontrollzellen).....	43
3.2	Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch Mikrotubulus-Toxine.....	45
3.2.1.1	Colchicin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen.....	45
3.2.1.2	MT-Depolymerisation nach Colchicin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und zur endothelialen Zell- Retraktion mit interendothelialer Lücken- bildung.....	47
3.2.1.3	Colchicin erhöht intrazelluläres F-Aktin.....	50
3.2.2.1	Vinblastin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen.....	52
3.2.2.2	MT-Hemmung nach Vinblastin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und endothelialer Retraktion mit interendothelialer Lückenbildung.....	53
3.2.2.3	Vinblastin erhöht intrazelluläres F-Aktin.....	56
3.2.3.1	Vincristin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen.....	58
3.2.3.2	MT-Hemmung nach Vincristin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und zur endothelialen Retraktion mit interendothelialen Lücken.....	59
3.2.4.1	MT-Stabilisation durch Paclitaxel führt zu keiner Permeabilitätszunahme pulmonaler Endothelzellen.....	61
3.2.4.2	Konfluente Endothelzellmonolayer nach MT-Stabilisierung durch Paclitaxel.....	62
3.3	Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch granulozytäre Wirkstoffe.....	65

3.3.1	HNE und H ₂ O ₂ erhöhen die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen.....	65
3.3.2	Zellretraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung nach Applikation humaner neutrophiler Elastase.....	66
3.3.3	Zellretraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung nach H ₂ O ₂ -Applikation.....	68
3.4	Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch F-Aktin-wirksame Toxine.....	70
3.4.1	Cytochalasin D und <i>Clostridium difficile</i> -Toxin B-10463: Massive Permeabilitätszunahmen pulmonaler Endothelzellen.....	70
3.4.1.1	Intakte MT-Systeme bilden interzelluläre Verbindungen bei massiver Cytochalasin D-induzierter F-Aktin-Fragmentierung.....	71
3.4.1.2	F-Aktin-Fragmentierung und intakte MT-Systeme pulmonaler Endothelzellen nach Applikation von <i>Clostridium difficile</i> -Toxin B-10463.....	74
3.5	Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch bakterielle Toxine.....	76
3.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> - α -Toxin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen.....	76
3.5.2	Destruktion von MT-Systemen und F-Aktin nach Applikation von <i>Staphylococcus aureus</i> - α -Toxin.....	77
3.6	Auswirkungen von Kombinationen MT-stabilisierender und MT-destabilisierender Substanzen auf das Zytoskelett pulmonaler Endothelzellen.....	79
3.6.1	Retraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung pulmonaler Endothelzellen korrelieren mit MT-Stabilisation bzw. Destabilisation.....	79
4.	Diskussion.....	82
4.1	Mikrotubulus-Systeme regulieren F-Aktin und die endotheliale Barrierefunktion.....	82
4.2	Stabilisation von Adhäsionsverbindungen pulmonaler Endothelzellen durch MT-Systeme nach F-Aktinverlust durch Cytochalasin D und TcdB-10463.....	87

4.3	Granulozytäre Wirkstoffe führen zu einer endothelialen Barriestörung durch Stressfaser- und Zelllücken-Bildung.....	91
4.4	Kombinierte MT- und F-Aktinalterationen durch <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin führen zu einer endothelialen Barriestörung.....	93
4.5	Tabellarischer Überblick.....	94
5.	Zusammenfassung	97
	Literaturverzeichnis.....	99
	Danksagung.....	117
	Lebenslauf.....	118
	Erklärung.....	119

1. Einleitung

1.1 Das Akute Respiratorische Distress-Syndrom (ARDS)

1967 beschrieben Ashbaugh et al. das Auftreten einer akuten respiratorischen Insuffizienz ohne kardiale oder pulmonale Primärerkrankung (3). Mittlerweile wird ein akutes nicht-kardiales Lungenödem nach extrapulmonalen Ereignissen unter dem Namen Akutes Respiratorisches Distress-Syndrom (ARDS) zusammengefasst und stellt ein persistierendes intensivmedizinisches Problem dar (37, 153). Die Letalität des ARDS liegt trotz intensiver Forschung und differenzierter Therapie bei etwa 60 % (37, 109, 150, 153). Ein ARDS kann auch bei bisher Lungengesunden als Folge eines massiven extrapulmonalen Prozesses auftreten, z.B. nach Sepsis, Polytrauma, hochgradigen Verbrennungen oder Schock. Ebenso können gravierende pulmonale Reize, z.B. Aspiration oder Pneumonie, das akute Krankheitsbild auslösen (37, 133). Die dem ARDS zugrundeliegenden Ereignisse führen zu einer Freisetzung von potenten inflammatorischen Entzündungsmediatoren. In Folge kommt es zu einer akuten pulmonalen Hypertension sowie zu einer Störung der endothelialen und epithelialen Schrankenfunktion der Lunge (37, 109, 150). Die vaskulär-endotheliale Permeabilität nimmt zu und es entwickelt sich ein zunächst interstitielles, später alveoläres Lungenödem bei normalen linksatrialen Druckwerten („non-cardiogenic pulmonary edema“). Nach dem Verlust der alveolo-epithelialen Barrierefunktion entsteht ein proteinreiches alveoläres Lungeninfiltrat, das zur Schädigung der Typ II-Pneumozyten beiträgt und zu einer Behinderung des Surfactantsystems führt (3, 133). Durch die Verminderung der Surfactantproduktion entstehen im weiteren Verlauf Mikroatelektasen, die eine Vergrößerung des Shunt-Volumens bewirken und in eine akute pulmonale Hypertension münden. Insgesamt resultiert aus diesen Veränderungen eine massive Verringerung der Gasaustauschfläche. Der Wirkungsgrad der Ventilation wird erheblich eingeschränkt. Dies führt meist zu einer schweren globalen respiratorischen Insuffizienz (37, 121). Eine schwere Hypoxämie

sowie die zunehmende Erschöpfung des Patienten machen häufig die kontrollierte Beatmung mit einem hohem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) und hoher Sauerstoffkonzentration erforderlich. Überlebt der Patient die akute Phase, kann sich eine proliferativ-fibrosierende Spätphase anschließen, die zu einem bindegewebigen Umbau der Gasaustauschfläche mit bleibender Beeinträchtigung der Lungenfunktion führt (37, 150, 153).

Für die Entstehung einer endothelialen Schrankenstörung mit Zunahme der Permeabilität spielt das pulmonal-endotheliale Zytoskelett eine wichtige Rolle (116, 123, 124, 139). Es setzt sich aus drei filamentären Polymeren zusammen: dem F-Aktin [Mikrofilamente (MF)], dem Mikrotubulussystem (MT) und den Intermediärfilamenten (IF). Diese drei Filamenttypen formen im Zusammenspiel mit spezifischen Bindeproteinen ein dynamisches 3-dimensionales Netzwerk, das der Zelle eine spezifische Form verleiht und auch zu Formveränderungen beitragen kann (41).

1.2 Pulmonale Endothelzellen

Vaskuläre Endothelzellen (EC) bilden einen kontinuierlichen Monolayer, welcher die innere Oberfläche (Intima) des gesamten vaskulären Gefäßsystems auskleidet. Hauptaufgabe dieses Zellverbandes ist die Regulation der Barrierefunktion zwischen Blut und Interstitium (1, 21, 124). Aufgrund seiner anatomischen Lokalisation ist der Endothelzellverband permanent hämodynamischen Belastungen ausgesetzt, die durch Blutfluss, Blutdruck und Gefäßwandausdehnung entstehen. Die Funktion als eingeschränkt durchlässiges System und Barriere zwischen Blut und Interstitium (semipermeable Barriere) setzt die strukturelle innere Integrität des Endothelzell-Monolayers voraus. Dieser muss gegenüber wechselnder hämodynamischer Belastung und einer Vielzahl zusätzlich widriger Bedingungen wie beispielsweise Ischämie, Hypoxie oder Exposition gegenüber bakteriellen und zellulären Toxinen anpassungsfähig sein (21, 135, 138). Darüber hinaus reagiert das Endothel auf

Gefäßverletzungen mit einem spezifischen Reparaturmechanismus in Form von Angiogenese und Reendothelialisation (1, 21). Viele dieser notwendigen Fähigkeiten des EC-Monolayers erfordern aktive Veränderungen der Zellform und gleichzeitige Anpassung der inneren isometrischen Kräfte. Viele Studien zu diesem Thema belegen, dass ein Aktin- und Myosin-gesteuertes kontraktiles Zytoskelett für aktive zelluläre Formveränderungen mitverantwortlich ist (21, 74, 116, 137). Neuere Arbeiten zeigen, dass auch dem Mikrotubulussystem in der Regulation kontraktiler Prozesse eine wichtige Funktion zukommt (57, 63, 104, 159).

1.3 Das Aktinfilamentsystem

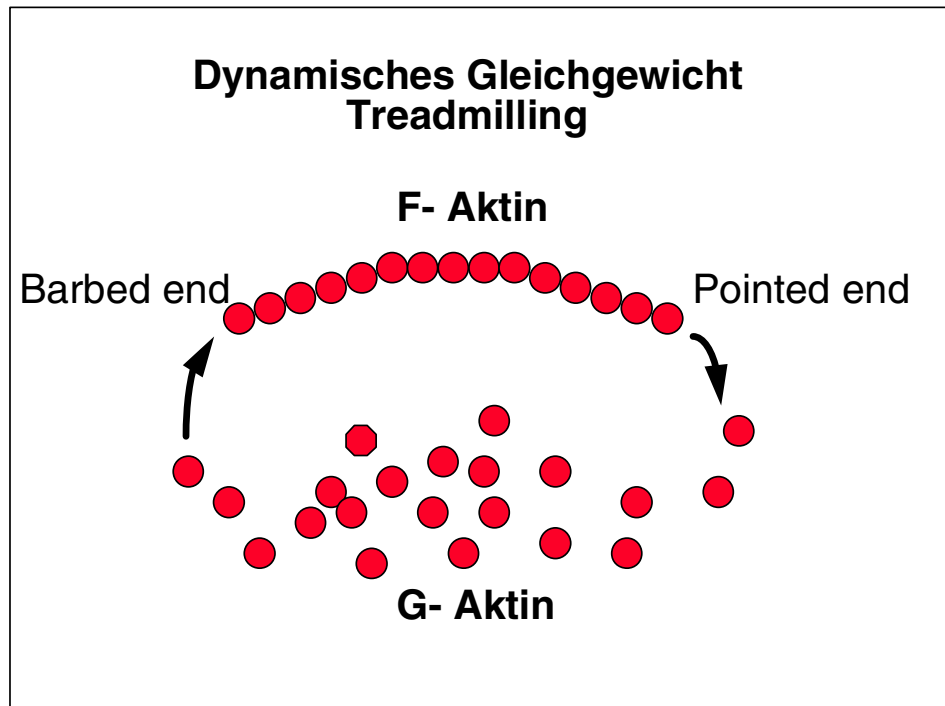
In Skelettmuskelzellen, der Herzmuskulatur und in den glatten Muskelzellen führen Aktinfilamente im kontrollierten Zusammenspiel mit Myosin zu einem geordneten Kontraktionsablauf. In vielen Eukaryontenzellen ist Aktin mit 5% das häufigste Zellprotein (1). In Endothelzellen ist der Anteil dieses Proteins mit 10,1% höher als im Vergleich zu den meisten anderen Nichtmuskelzellen (21, 45). Myosin ist in Verbindung mit Mikrofilamenten die aktiv-kraftauslösende Komponente. Nach Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosinproteins beispielsweise durch die Myosinleichtkettenkinase wird in Gegenwart von Ca^{2+} und Calmodulin die Kontraktion in Verbindung mit F-Aktin reguliert (1, 73, 116). In ruhenden Endothelzellen findet sich der Hauptanteil des filamentären Aktins in der Zellperipherie. In engem Kontakt zur Zellmembran bildet es dort ein dichtes Netzwerk („peripheral dense band“), das der Zelle mechanische Stabilität verleiht und über spezifische Bindeproteine Kontakte zu Nachbarzellen und zur extrazellulären Matrix aufrechterhält (1, 41, 74, 156).

1.3.1 Aufbau des Aktinfilamentsystems

Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus polymerisierten Aktinmonomeren (G-Aktin). Mit einem Durchmesser von ca. 7 nm stellen sie die dünnste filamentäre Struktur des Zytoskeletts dar und werden daher auch als Mikrofilamente (MF) bezeichnet. Aktinfilamente sind dynamische Strukturen, d.h. sie sind in einem permanenten Auf- und Abbau. Es können drei Gruppen filamentären Aktins in Endothelzellen unterschieden werden, die unterschiedliche zelluläre Aufgaben erfüllen (vgl. Kap. 1.3.3): 1. F-Aktinnetz des Zellkortex, 2. F-Aktin des Adhäsionsgürtels und der Fokalkontakte, 3. F-Aktin der Stressfasern. Die unterschiedlichen Aufgaben werden über eine große Anzahl Aktin-bindender Proteine gesteuert (vgl. Kap. 1.3.2).

Filamentäres Aktin entsteht durch Polymerisation von glomerulären Aktinmolekülen (G-Aktin) (99, 123, 126). G-Aktinmoleküle liegen als Monomere im Zytoplasma vor. An jedes G-Aktinmonomer sind ein Ca^{2+} - und ein ATP-Molekül gebunden. Sie können sich sehr schnell zusammenlagern und wieder trennen (110, 126). Die Anlagerung an das sog. „barbed“ Ende eines Aktinfilaments (s.u.) erfolgt durch Hydrolyse von ATP zu ADP. Der erste Schritt zur Polymerisation verläuft durch Bildung eines Dimers aus zwei G-Aktinmonomeren und anschließender Verknüpfung zu einem Trimer (Nukleation) (1, 64, 99). Die weitere Verlängerung (Elongation) zu einem Polymerfaden vollzieht sich mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit, die ein konstantes Polymerisationsplateau entwickelt, wenn eine kritische Konzentration an Aktinmonomeren erreicht ist (1, 11, 64). Aktinfilamente besitzen eine strukturelle Polarität, d.h. obwohl grundsätzlich beide Enden zur Polymerisation imstande sind, besteht jeweils eine unterschiedliche Polymerisationskinetik und eine entsprechend unterschiedliche kritische Konzentration der beiden Filament-Enden. Am „barbed“ Ende (Plus-Ende) polymerisieren die monomeren Aktinmoleküle bei einer niedrigeren G-Aktin-Konzentration als am „pointed“ Ende (Minus-Ende) (1, 11, 73). Da die G-Aktin-Konzentration unter physiologischen Voraussetzungen zwischen den kritischen Konzentrationen im Bereich der beiden Filamentenden liegt, führt dies am „barbed“

Ende zur Polymerisation und am „pointed“ Ende zu Abdissoziation. Dabei herrscht ein Fließgleichgewicht, an dem im gleichen Maße Aktinmonomere an einem Ende angelagert und am anderen Ende abgespalten werden (siehe Schema 1), so dass das Nettowachstum der Filamente gleich Null ist. Dieser Vorgang wird als „Treadmilling“ bezeichnet (1, 11, 64, 99, 123).



Schema 1: Modellvorstellung des F-Aktin-Gleichgewichtes. Durch Anlagerung von G-Aktin-Molekülen am „barbed end“ und Abdissoziation am „pointed end“ des Aktinfilaments entsteht ein dynamisches Gleichgewicht.

1.3.2 F-Aktin-assoziierte Proteine

Tatsächlich ist diese Modellvorstellung des Schema 1 sehr vereinfachend, denn es existieren eine Reihe Aktin-bindender Proteine, die den dynamischen Umsatz des Aktins kontrollieren können und unter anderem Lage und Länge, Aktivierung und Abbruch der Aktinpolymerisation bestimmen (1, 73, 101, 123). So konnten in

Untersuchungen unterschiedlichen F-Aktin-assoziierten Proteinen spezifische Funktionen zugeordnet werden. Zum Beispiel führte das Protein Profilin durch Bindung von G-Aktinmonomeren zu einer Aktivierung der Polymerisation neuer Aktinfilamente. Sogenannte Capping-Proteine, wie das Ca^{2+} -abhängige Gelsolin, konnten Aktinfilamente durchtrennen und sich anschließend selektiv an das „barbed“ Ende des Filamentbruchstücks binden. Auf diese Weise wurde eine weitere Anlagerung von G-Aktinmonomeren gehemmt (1, 5, 30, 123). Tropomyosin schützte dagegen die Filamente durch Längsstabilisierung vor Fragmentierung und modulierte die Aktin-Myosin-Interaktion (1, 123, 130). Mitglieder der Myosin-Superfamilie wurden als molekulare Transporter beschrieben, die Lasten über die MF-Oberfläche transportieren können. Ferner bilden Myosinmoleküle in Verbindung mit Aktinfilamenten zelluläre kontraktile Einheiten (1, 5, 67, 116). Einer anderen Gruppe von Aktin-assoziierten Proteinen, Filamin und Spectrin, konnten zwei F-Aktin-Bindungsstellen nachgewiesen werden, die durch Quervernetzung (cross-linking) von Mikrofilamenten die Bildung von intrazellulären gelartigen Netzwerken ermöglichen. Die F-Aktin-assoziierten Proteine Fimbrin und α -Actinin führten zu einer Bündelung von parallel angeordneten Aktinfilamenten (1, 5, 130).

1.3.3 Funktion des F-Aktin-Systems

1.3.3.1 Zellkortex und Mikrofilamente

In Endothelzellen bilden Aktinfilamente mit den filamentären Hauptkomponenten Myosin und Fodrin (analog des erythrozytären Spectrin) in der Zellperipherie in engem Kontakt mit der Plasmamembran ein dichtes Netzwerk, den Zellkortex. Beobachtungen an Endothel- und Nichtendothelzellen zufolge trägt der Zellkortex u. a. zur mechanischen Stabilisierung der Zelle bei, beteiligt sich an der Umformung der Plasmamembran und steuert die Prozesse der Endo- und Exocytose (21, 41, 156).

1.3.3.2 Junktionale F-Aktin-Verbindungen

Junktionale Aktinfilamente dehnen sich mehr oder weniger kontinuierlich über die gesamte Peripherie der EC aus und werden häufig als „peripheral dense band“ bezeichnet. Vielen Studien zufolge sind solche Mikrofilamente erheblich an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Endothelzellverbandes beteiligt (2, 21, 24, 74, 116). Durch verschiedene Bindeproteine (z. B. α -Actinin, Vinculin, Talin und Fibronectin-Rezeptor) bestehen indirekte lokale Verknüpfungspunkte zwischen intrazellulären Mikrofilamenten und der extrazellulären Matrix (Fokalkontakte) bzw. den benachbarten Endothelzellen (Adhäsionsgürtel) (1, 6, 21, 74). Depolymerisation von Aktinfilamenten (z.B. durch Cytochalsin D, Botulinum C2-Tox.) führten zur interzellulären Lückenbildung (Gaps) einhergehend mit einer ausgeprägten Barrierestörung des Endothels (24, 139), während Stabilisierung der MF durch Phalloidin den Monolayer geschlossen hielt (2, 21, 24). Eine Permeabilitätszunahme konnte auch durch Hemmung der kleinen GTP-bindenden Rho-Proteine beobachtet werden. Die Inkubation mit *Clostridium difficile* Toxin B-10463 führte über Glykosylierung an Threonin 37 zu einer Hemmung der Rho-Proteine, was einen Verlust von Aktinfilamenten bewirkte. Vorinkubation mit Phalloidin führte zu keiner Permeabilitätszunahme (51). Diese Beobachtungen zeigten, dass junktionale Aktinfilamente eine Stützfunktion der Adhäsionsverbindungen ausüben und daher anteilig die Barrierefunktion der Endothelzelllayer und den parazellulären Austausch von Lösungen und Makromolekülen regulieren.

1.3.3.3 Mikrofilamentäre Stressfasern

Mikrofilamentäre Stressfasern (SF) ähneln in ihrem Aufbau den Sarkomeren der Muskulatur. Ihre Hauptkomponente besteht aus dicht gebündeltem F-Aktin. Zusätzlich enthalten SF Myosinfilamente sowie weitere Proteine wie α -Actinin, Tropomyosin, Myosinleichtkettenkinase, Caldesmon und Vinculin (12, 21, 67). SF

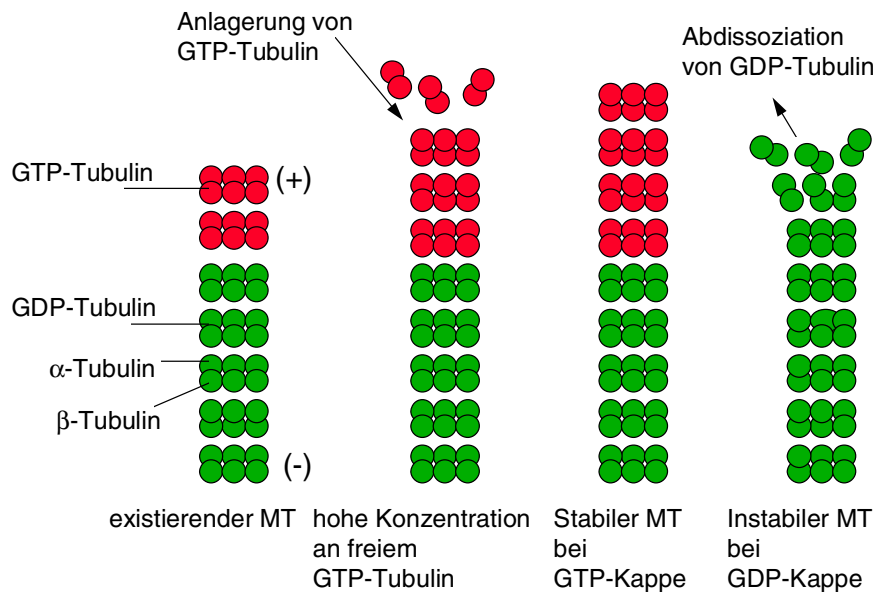
wird eine protektive Funktion innerhalb von EC und Endothelmonolayer gegenüber Verletzungen durch erhöhte Scherkräfte zugesprochen (10, 21, 22, 25, 29, 156). In EC wurde vermehrte Stressfaserbildung insbesondere in solchen Bereichen beobachtet, die strömungsbedingten Scherkräften ausgesetzt waren (21, 29, 41, 156). SF sind häufig nahe der oberflächlichen Plasmamembran lokalisiert und reichen mit ihren Enden in Bereiche der Plasmamembran, die mit der extrazellulären Matrix (Fokalkontakte) eng verbunden sind. Die Fähigkeit zur Kontraktion und die Verbindung mit Fokalkontakten innerhalb der Plasmamembran ermöglicht es SF nach aussen gerichteten Zugkräften entgegen zu wirken und die Zelle vor Verletzungen zu schützen (5, 12, 22, 25, 29, 133, 156). F-Aktinverlust durch Doxorubicin und Cytochalasin D zeigte einen signifikanten Rückgang des Widerstandes gegenüber strömungsbedingten Scherkräfte (21). Ferner können SF im Zusammenwirken mit Myosin und der MLCK kontraktile Einheiten bilden, die zu Gap-Bildung und Permeabilitätszunahmen pulmonaler EC führen (34, 73, 116, 121, 124, 158).

1.4 Mikrotubulussystem der Zelle

1.4.1 Aufbau des Mikrotubulussystems

Mikrotubuli (MT) bilden zylindrische Strukturen, die sternförmig vom paranukleär lokalisierten Zentrosom (MT-Keimbildungszentrum) in die Zellperipherie ausstrahlen. Mit einem Durchmesser von 25 nm stellt dieses System den dicksten zytoskelettären Filamenttyp (1, 72, 75). Ein Mikrotubulus setzt sich aus 13 Protofilamenten zusammen, die jeweils aus einer Folge von polymerisierten Dimeren aufgebaut sind. Ein Dimer besteht aus zwei ähnlich strukturierten globulären Proteinen, dem α - und β -Tubulin (77, 78). Eukaryonte Zellen besitzen verschiedene Isoformen von α - und β -Tubulin. Zusätzlich sind im Zentrosom γ -Tubuline lokalisiert. γ -Tubuline werden als Ausgangspunkt des Wachstums der mikrotubulären Filamente beschrieben (77, 78, 85, 87, 160). Alle Protofilamente sind parallel und mit der gleichen α/β -Ausrichtung

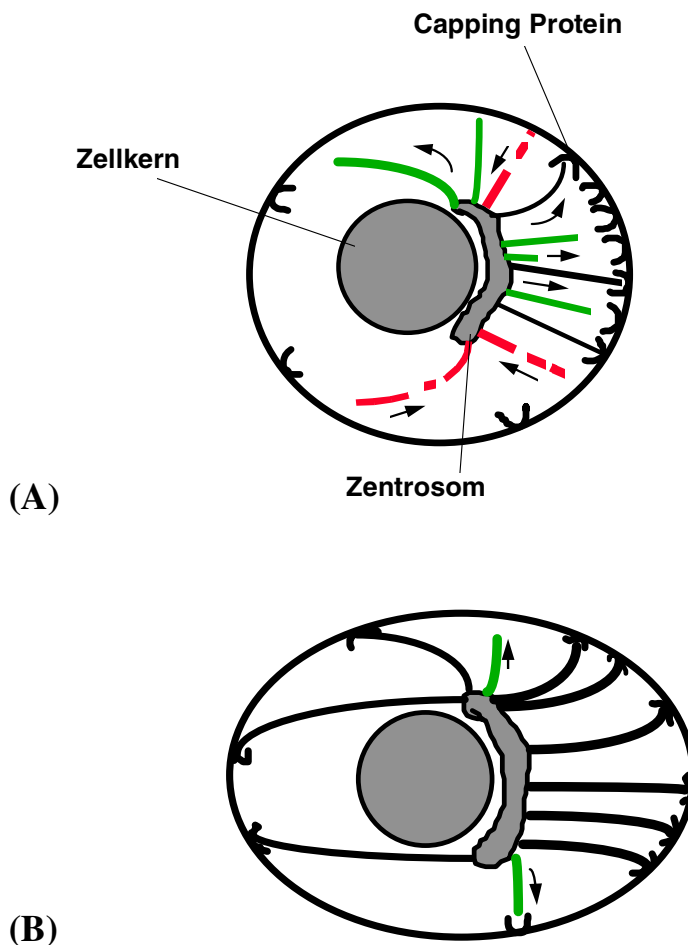
aneinander gelagert. Durch diese Anordnung der Protofilamente erhält jedes Mikrotubulusfilament eine Polarität mit einem „Plus-Ende“ und einem „Minus-Ende“ (1, 72, 81). Jedes Plus-Ende zeigt vom Zellkern in Richtung Zellmembran, während das Minus-Ende in die entgegengesetzte Richtung weist und im Zentrosom verankert ist.



Schema 2: Schematische Darstellung der Polymerisation und der Depolymerisation von MT-Systemen. GTP-gebundene Tubulin-Dimere lagern sich vornehmlich an die Plus-Enden existierender MT an. Nach dem Einbau erfolgt die GTP-Hydrolyse zu GDP. MT, die eine GTP-Kappe tragen, sind stabiler und können weitere GTP-Tubuline anlagern. MT, die eine GDP-Kappe tragen, sind instabiler und können rasch depolymerisieren.

Die Polymerisation am Plus-Ende von Mikrotubulusfilamenten erfolgt unter Aggregation von globulären Tubulinuntereinheiten bei GTP-GDP-Nukleotid-Hydrolyse. Schnelles Filamentwachstum führt zu einer „GTP-Kappe“, die eine höhere Affinität zu Tubulin-Untereinheiten besitzt als GDP. Dies führt zur beschleunigten Anlagerung weiterer Tubulinmoleküle und zum schnelleren Wachstum des Filamentes (72, 77, 78, 84, 85). Umgekehrt hat ein langsames Filamentwachstum den Verlust der

GTP-Kappe zur Folge. Da GDP-Tubuline eine niedrige Affinität zu Tubulinuntereinheiten besitzen und leichter vom Mikrotubulusfilament abdissoziieren, verliert das Mikrotubulusende mit GDP-Kappe schneller Untereinheiten. Eine beschleunigte Depolymerisation ist die Folge, was wiederum zu einem rasanten Zerfall der Mikrotubulusfasern führt (1, 69, 78, 85). Man bezeichnet diese charakteristische Mikrotubuluskinetik als „dynamische Instabilität“ (1, 32, 72, 77, 84, 125). Es wird vermutet, dass die dynamische Instabilität das MT-System dazu befähigt spezielle Bereiche in der Zellmembran „zu suchen und einzufangen“ (32). Stetiges Wachstum oder rasanter Zerfall bewirken, dass sich die Ausrichtung der vom Zentrosom aus wachsenden Mikrotubulussysteme in der Zelle ständig ändern kann. Um den raschen Abbau eines wachsenden Mikrotubulus zu hemmen, kann das schnell wachsende Plus-Ende des Filaments durch Capping-Proteine fixiert werden (84). An prädisponierten Stellen innerhalb der Zelle (1, 32), beispielsweise an der Zellmembran, kann durch Verknüpfung des Mikrotubulus-Filamentendes eine Fixierung und Stabilisierung des Mikrotubulus bewirkt werden (vgl. Schema 3).



Schema 3: Modellvorstellung zur selektiven Stabilisierung von Mikrotubuli.

Durch das Fixieren der schnellwachsenden mikrotubulären Plus-Enden (grün dargestellt) an prädisponierten Stellen in der Zellmembran durch Capping-Proteine werden die mikrotubulären Filamente stabilisiert (schwarz dargestellt), und die Zelle wird von einer unpolarisierten (A) in eine polarisierte Form (B) überführt. Auswachsende Mikrotubuli, die nicht stabilisiert wurden, werden instabil (dynamische Instabilität) und zerfallen in Tubulineinzelmoleküle (rot-gestrichelt dargestellt).

Auf diese Weise kann von bestimmten Zellstrukturen, zum Beispiel Capping-Proteinen der Zellmembran, eine Art selektive Auswahl von Mikrotubuli erfolgen. In neusten Studien wird ein Protein der CLIP-Gruppe (cytoplasmatic linker protein) beschrieben, welches auf dem wachsenden MT-Plus-Ende akkumuliert und als „MT-Fänger“ spezielle kortikale Regionen erkennen kann (32). Die molekulare Verbindung zwischen Plus-Ende und Zellkortex ist derzeit noch unklar, jedoch könnte nach

Fukata et al. eine Komplexverbindung zwischen CLIP-170 und den aktivierten GTPasen Cdc42 und Rac1 im Aktinkortex entstehen (32). Es konnte gezeigt werden, dass Cdc42 und Rac1 das Plus-Ende der MT im Zellkortex einfangen konnten (32). Diesen kleinen GTPasen wird eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Zellpolarität zugesprochen (32, 47). Durch die Lageänderung von Mikrotubuli innerhalb der Zelle kann die Ausrichtung von Zellorganellen neu strukturiert und die Zellpolarität verändert werden (1, 32, 75). Dieser Vorgang ist essentiell bei polarisierten zellulären Prozessen, wie z.B. bei gerichteten Zellbewegungen, Aufstellung der mitotischen Spindel oder Ausrichtung von T-Zellen zum Antigen (1, 32, 40, 84).

1.4.2 Mikrotubulus-assoziierte Proteine

Zur Ausbildung und Organisation der Mikrotubulusstruktur in Zellen tragen eine Vielzahl von MT-assoziierten-Proteinen (MaP) bei (1, 72, 90). MaPs regulieren den Transport membrangebundener Vesikel in antero- oder retrograder Richtung über die als Leitschienen fungierenden MT-Filamente (108, 113, 131). MaPs sind an der Verbindung von Mikrotubuli und zytoplasmatischen Organellen beteiligt (108). Ferner initiieren die Proteine Tubulin-Polymerisation und stabilisieren MT-Systeme (46, 75, 113). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MaPs bei der mikrotubulären Verbindung mit Intermediärfilamenten (7, 103, 113) und Mikrofilamenten beteiligt sind (18, 44, 113) und zur Ausbildung der dynamischen 3-dimensionalen Form des Zytoskeletts beitragen (1, 56, 108, 113). Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen: die strukturellen und die dynamischen MaPs (72, 77). Zu den strukturellen MaPs zählen die Hochmolekularproteine MaP1 und MaP2 und die niedermolekularen Tau-Proteine, die zur Polymerisation von Tubulinmolekülen und zur Stabilisierung der Mikrotubulusstruktur beitragen (75, 90, 113). Zu den dynamischen MaP-Familien gehören die Motorproteingruppen Kinesine und Dyneine. Dabei handelt es sich um Proteine, die als „Carrier“ spezifisch an MT

binden. Ihre wesentliche Aufgabe besteht im zytoplasmatischen Membranverkehr, Endo- und Exocytose und der Organellenausrichtung (108, 117, 147). Die Entdeckung von Kinesin durch Vale 1985 und Dynein von Paschal 1987 als Kraft erzeugende dynamische Mikrotubulus-assoziierte Proteine führte erstmalig zu der Hypothese, dass Motor-Proteine Zellkomponenten entlang der Mikrotubuli bewegen können (117). Dabei zeigte sich, dass Kinesin membrangebundene Vesikel in Richtung der Zellmembran (Plus-Ende) der Mikrotubulusstränge und Dynein in die entgegengesetzte Richtung zum Minus-Ende ziehen (68, 72, 78, 117, 146, 147, 148). Für die gezielte und spezifische Aktivierung der Motorproteine Kinesin und Dynein, die membrangebundene Komponenten entlang der Mikrotubuli bewegen, wurden weitere Proteine gefunden (95, 96). Schroer et al. (118) identifizierten spezifische lösliche Faktoren „Aktivatoren I-II“ für die Ingangsetzung des Motorprotein Dynein. Andere Hauptkomponenten solcher dynamischer Komplexe wurden als p150^{glued} (54) und Dynactin (36, 39) beschrieben. Eine Reihe von „cytoplasmic linker proteins“ (CLIPs) scheint in die Bindung endozytischer Vesikel an Mikrotubuli (96) und in die Komplexbildung zwischen MT und Zellkortex im Rahmen der Zellpolarisation (32) involviert zu sein.

1.4.3 Funktion des Mikrotubulus-Systems

Mikrotubulus-Systeme spielen eine wesentliche Rolle bei der inneren und äußeren Organisation eukaryontischer Zellen (1, 72). Als Komponente des dreidimensionalen zytoskelettären Netzwerkes filamentärer Strukturen sind MT am Aufbau und Erhalt der Zellform und Zellpolarität beteiligt (57, 75, 91). Innerhalb zellulärer Austauschprozesse wie Sekretion, Endozytose und Transzytose liefert dieser Filamenttyp die Basis für gezielten Transport zytoplasmatischer Bestandteile (71, 108, 147). Durch die langen und steifen Röhren, die sich zellkernnah in die Peripherie erstrecken und von prädisponierten Capping-Proteinen in der Zellmembran fixiert werden können, entsteht ein stabiles, flexibles und effektives Leit- und

Transportsystem. Entlang dieser dynamischen „Schienen“ werden gleichzeitig Klassen unterschiedlicher Organellen (z.B. Endosomen, Lysosomen, Mitochondrien, variierende Typen von sekretorischen Vesikeln) geführt und mit Hilfe von Motorproteinen in anterograde oder retrograde Zielrichtungen bewegt und positioniert (48, 71, 75, 80, 94, 131). Eine der Hauptfunktionen von MT-Systemen besteht in der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität von Zytoskelett und Zellform (35, 56, 91). MT beeinflussen die Zellpolarität einer Zelle (1, 32, 75) und sind durch die Ausrichtung der Zellorganellen und die Ausspannung der Intermediärfilamente in die Veränderung bzw. Regulation der Zellform involviert (35, 91). Durch die spezifische Polymerisationskinetik der steifen MT-Röhren (dynamische Instabilität) können nach außen gerichtete Zugkräfte der Zellwand aufgebaut werden, wodurch einwärts gerichteten Kräften des Aktin-Zytoskeletts entgegengewirkt werden kann (19, 20, 56, 59). MT-Systeme scheinen darüber hinaus an der Regulation und Koordination von Zellbewegungen beteiligt zu sein. MT-depolymerisierende Substanzen zeigten in Experimenten mit Fibroblasten eine deutliche Kontraktilitätszunahme, den Verlust der Zielbewegungsrichtung und die Aufhebung der Zellpolarität (33, 57, 149). Die Applikation von Colcemid führte bei Untersuchung mit Nerven-Wachstums-Kegeln zu einer signifikanten Retraktion (20, 59). Studien Enemotos zufolge können MT zu einer Integration unkoordinierter F-Aktindynamik in koordinierte und direktionale Bewegungsabläufe führen (23). So zeigte der Einsatz depolymerisierender Substanzen in mehreren Studien mit Fibroblasten unkoordinierte Bewegungsabläufe. Darüber hinaus stellte sich nach MT-Depolymerisation neben unkoordinierten Zellmotilitätszunahmen eine Ausreifung fokaler Adhäsionen kombiniert mit Stressfaserbildung heraus (6, 23, 70, 97). Eine weitere wichtige Funktion von MT-Strukturen scheint daher in der Koordination und Regulation von Zell/Zell- und Zell/Matrixverbindungen zu bestehen. Rinnerthaler et al. zufolge sind freie MT-Enden mit fokalen Adhäsionen verknüpft und beeinflussen und beschleunigen die fokale Kontaktentwicklung (105). Eine wichtige Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang den kleinen GTP-bindenden Rho-Proteinen zuzukommen, die ihrerseits fokale Adhäsionen, Stressfaser-Bildung und

Zellkontraktilität induzieren können (63, 70, 106). Vorinkubation mit Rho-Kinase-Inhibitoren vor MT-Zerstörung zeigten abgeschwächte Effekte bezüglich der Ausbildung von fokalen Adhäsionen und Stressfasern. Die Resultate führten zu dem Schluss, dass MT-Systeme über Rho-Kinase-Signalwege und MLC-Phosphorylierung eine regulatorische Funktion auf aktomyosin-basierende Kontraktion, Stressfaser- und Fokalkontakt-Bildung ausüben (63, 70, 106, 159).

Die unterschiedlichen Funktionen von MT-Systemen wie Zellformerhaltung, Transportfunktion, Zellbewegungen und Koordination von Zell-Zell- und Zell-Matrixverbindungen legen die Vermutung nahe, dass MT auch zur Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion beitragen. Neuere Untersuchungen von Verin et al. zeigten anhand elektrischer transendothelialer Widerstandsmessungen eine direkte Korrelation zwischen der MT-Depolymerisation und endothelialer Barrierefunktionsstörung (151).

1.5 Interaktionen von Mikrotubulus- und Aktinfilament-Systemen

Das Verständnis der Funktion des Zytoskeletts in Zellen und Geweben erschließt sich nach Einschätzung Ingbers nur teilweise durch die isolierte Analyse von Einzelsubstanzen, sondern vielmehr durch das globale Verständnis ihrer gegenseitigen Verknüpfung (56). MT-Interaktionen mit Intermediärfilamenten (7, 103) und mit Mikrofilamenten (18, 44, 113) konnten beschrieben werden. MT und MF bilden auf der Basis von inneren Zugspannungen und Druckkräften Komponenten einer ausbalancierten „höheren molekularen Architektur“ (56). Trotz unterschiedlicher Grundfunktionen, unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung und differierender zellulärer Lokalisation scheinen die zytoskelettären Systeme miteinander verwoben zu sein und in mancherlei Hinsicht zu kooperieren. 1978 konnten die Interaktionen zwischen Mikrotubulus- und Aktinfilamentsystemen von Griffith und Pollard biochemisch belegt werden (43, 44, 122). Sie zeigten, dass Mixturen von gereinigten

Aktin- und Mikrotubulusfilamenten eine höhere Viskosität aufwiesen als die individuellen Komponenten. Den filamentassoziierten Proteinen wurde in diesem Zusammenhang als Interaktionskomponente eine wesentliche Funktion zugesprochen. MT-assoziierte Proteine (MaP) können mit Aktinfilamenten Verbindungen eingehen, Kreuzbrücken aufbauen und Aktinfilamente bündeln (18, 19, 113). Es konnte gezeigt werden, dass in vitro Interaktionen von MaPs und Aktinfilamenten durch Phosphorylierung der MaPs reguliert wurden (86, 113, 122). Darüber hinaus zeigten Cross et al., dass Tau-Proteine neben ihrer stabilisierenden Interaktion mit MT-Oberflächen ebenso an mikrofilamentäre Stressfasern binden konnten (18). Die Feststellung, dass Mixturen von MaP, Aktin- und MT-Filamenten gelartige Netzwerke bilden, führte zu der Vermutung, dass MaPs mindestens zwei Bindungsregionen (Mikrotubulus/Aktin-Domäne) aufweisen müssen, die räumlich getrennt auf dem Molekül lokalisiert sind (18, 113). Interaktionen zwischen MT und MF bestehen auch innerhalb des intrazellulären Membranverkehrs. Beide Systeme verfügen über Motorproteine, die den Membrantransport entlang der Filamente regulieren. So konnte gezeigt werden, dass membranöse Vesikel sowohl über MT- als auch über Aktinfilamente geführt wurden. Dies würde eine gemeinsame Leitschienenfunktion mit gemeinsamem Aktin- (Myosin) und MT-Motorproteinen (Dynein, Kinesin) auf Vesikeloberflächen voraussetzen (39).

Filamentäre Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen MT und MF bestehen auch im Bereich der Zell/Zell- und Zell/Matrixverbindungen. In umfangreichen Studien konnte demonstriert werden (vgl. Kap. 1.3.3.2 und Kap. 1.4.3), dass MT-Depolymerisation zu fokalen Adhäsionen, Stressfaser-Bildung und Aktomyosin-basierender Kontraktionszunahme führte. Die meisten Untersuchungen stellten ursächlich eine Aktivierung der Rho-induzierten Signalkaskade in den Vordergrund. Neuste Studien stellen in diesem Zusammenhang mit GEF-H1 ein an MT gebundenes Protein vor, welches die MT-induzierte Interaktion und Regulation mit F-Aktin steuern könnte (65). MT-Depolymerisation führte zur Freisetzung und Aktivierung von GEF-H1, wodurch die Rho-Kaskade mit aktinfilamentärer Kontraktilitätszunahme und

Stressfaserbildung in Gang gesetzt wurde. Inwieweit direkte MT-MF-Verknüpfungen in Zell/Zell- und Zell/Matrixverbindungen zur Aufrechterhaltung von Adhäsionsverbindungen und Barrierefunktion bestehen, ist derzeit noch unklar. Eine Kollokalisierung zwischen MT und Stressfasern im Bereich fokaler Kontakte in Fibroblasten wurde von Rinnerthaler et al. beschrieben (105).

1.6 Endothel-Permeabilität

Endothelzellen bilden als Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum eine semipermeable Barriere, die unterschiedlichen physikalischen Einflüssen (Schubspannung, Blutdruck) ausgesetzt ist und sowohl den Austausch von im Blut gelösten Substanzen als auch die Passage korpuskulärer Elemente kontrolliert. Verschlechterung der endothelialen Barrierefunktion resultiert in vaskulären „Leakage“ und interstitieller Ödembildung (21, 74, 137). Aufgrund seiner exponierten Lage kann der Endothelzellmonolayer Ziel unterschiedlicher Stimuli werden, die auf unterschiedlichen Wegen zu einer vaskulären Permeabilitäts-Zunahme führen. Inflammatorische Prozesse sind häufig Ursache parazellulärer Flüssigkeitszunahmen. Unter entzündlichen Bedingungen bilden sich als Antwort auf verschiedene endogene und exogene Mediatoren interzelluläre Lücken und Spalten (Gaps) zwischen benachbarten ECs (49, 74, 116, 127). Viele Studien belegen die Kontrollfunktion des kontraktilen aktinfilamentären-Zytoskeletts bei der Regulation parazellulärer endothelialer Permeabilität (21, 51, 74, 116, 137, 139). Depolymerisation von Aktin-Filamenten durch Cytochalasin D oder Botulinum C2-Toxin resultierten in einem Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion (24, 51, 123), während die Stabilisierung der MF mit Phalloidin die Schrankenfunktion der Monolayer nicht verschlechterte (2, 21, 24.). Studien von Schnittler und Mitarbeitern demonstrierten, dass Gap-Formierung durch Aktomyosin-abhängige kontraktile Mechanismen über die MLCK (in Gegenwart von ATP und Ca^{2+}) gesteuert wurden und die Kontraktionen im Bereich der junctionalen Netzwerke entstanden (34, 116, 124).

Komplexe Aktin-basierende Systeme verankern Zell/Zell- bzw. Zell/Matrix-Verbindungen. Im Bereich fokaler Kontakte verbinden Transmembranrezeptoren (z.B. Integrine) über junktionale Bindeproteine (z.B. Vinculin, Talin, α -Actinin) indirekt F-Aktin. Als Antwort auf entzündliche Mediatoren werden Signalwege diskutiert, die über junktionale Aktin-Systeme zu einer Permeabilitätszunahme führen. Ein Signalweg basiert auf der über Proteinkinase C (PKC) spezifischen Phosphorylierung junktionaler Bindeproteine. Dies führte zu Aktin-Reorganisation, Zellabrundungen und Zunahme parazellulärer Permeabilität (23, 74). Ein anderer Signalweg erfolgte über die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), welche zu einer auf Aktomyosin-basierenden zellulären Kontraktion führte (63, 70). Die EC-Barriere wird über kontraktile Kräfte und „Zugseilmechanismen“ reguliert, die in ihrer Funktion ein intaktes Zytoskelett (MF, MT, IF) voraussetzen (56, 151). Neuere Studien zeigten, dass auch Mikrotubulussysteme an der Regulation kontraktiler Prozesse beteiligt sind (56, 57, 63, 125, 104, 159). Studien von Verin und Mitarbeitern zufolge führte Depolymerisation von MT zu einer Erniedrigung transendothelialer elektrischer Widerstände (Barriestörung), während Vorinkubation des MT-Stabilisators Paclitaxel diesen Effekt abschwächte (151). Die biochemischen Wege, die zytoskelettäre Veränderungen und Kontraktionen nach MT-Störung verursachen, sind nicht eindeutig geklärt. Doch deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass MT-Zerstörung zu einer Freisetzung von GEF-H1 und konsekutiv zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung über eine Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Rho-Proteine führt (63, 65, 70, 151).

1.6.1 In vitro Modell zur Messung endothelialer Permeabilität

Zur Untersuchung endothelialer Permeabilität finden zahlreiche Modelle Anwendung. Während in vivo-Modelle und/oder Untersuchungen an isolierten Organsystemen [z.B. isolierte, blutfrei perfundierte und ventilierte Kaninchenlunge (120)] auf applizierte Stimuli komplexe Summenantworten ergeben, können in vitro-Modelle an isolierten Zellen die biologische Komplexität des Systems deutlich verringern und

kleinere Informationseinheiten hoher analytischer Aussagefähigkeit gewinnen. Zahlreiche Transwell-Modelle arbeiten bei der Bestimmung der Permeabilität kultivierter EC auf dem Prinzip der Diffusion (49, 50). Im Vergleich zu anderen in vitro-Modellen unterscheidet sich das in der vorgelegten Arbeit verwendete Modell insbesondere durch die Applikation eines hydrostatischen Drucks auf die luminal Seite des Endothelzellmonolayer während des gesamten Versuchszeitraums (50, 51, 116, 133, 136, 138, 139). Die Untersuchung der endothelialen Permeabilität isolierter Zellen erfolgt bei diesem Modell somit nicht unter diffusiblen, wie bei oben genannten Transwell-Systemen, sondern unter konvektiven Versuchsbedingungen. Dabei reagierten die Endothelzellen zu Versuchsbeginn mit einer erhöhten Wasserflussrate bei geringer Selektivität des Monolayers. Nach 20-40 Minuten kam es dann zu einem Abfall der Wasserfiltration und zu einem Anstieg der Membranselektivität für Albumin („Sealing“) auf Werte, die weitgehend der vivo-Situation entsprechen (16, 133, 136, 137).

1.7 Toxine, die in die Regulation des Mikrotubulussystems eingreifen

Zur Untersuchung der Bedeutung des MT-Systems für die Regulation der endothelialen Barriere können Spindelgifte eingesetzt werden. Diese Substanzen hemmen die MT-Synthese und führen zu einer Störung der Spindelbildung in der Mitose. Zu dieser Gruppe zählen u.a. Colchicin, die Vinca-Alkaloide und Paclitaxel.

1.7.1 Colchicin

Colchicin ist ein aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) gewonnenes Alkaloid, das seit Jahrhunderten als antiinflammatorisches Medikament Verwendung findet (1, 119). Der Haupteffekt der Substanz besteht in der Hemmung der Mikrotubulussynthese. Colchicin bindet spezifisch an Tubulin („site-specific-binding“)

und verhindert die Polymerisation zu Multimeren ohne die Depolymerisation zu beeinflussen. Dies führt zu verstärktem Mikrotubulusabbau (1, 17, 27, 66, 91, 152). Therapeutisch wird Colchicin in niedriger Dosierung zur prophylaktischen, in hoher Dosierung zur therapeutischen Behandlung des akuten Gichtanfalls eingesetzt (119). Durch Hemmung der Leukozytenbeweglichkeit kommt es wahrscheinlich zu einer Hemmung der Phagozytose von Urat (1, 17, 26). Neuere Studien deuten auf eine Intervention der Substanz auch in die Neutrophilen-Endothel-Interaktion hin (17, 66).

1.7.2 Vinca-Alkaloide

Vinca-Alkaloide ist die Sammelbezeichnung für Alkaloide aus Immergrünarten, besonders *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*). Vinblastin und Vincristin sind natürliche Alkaloide aus *Vinca rosea* und werden als Chemotherapeutika bei verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt (79, 102). Obwohl die Alkaloide Vinblastin und Vincristin nur kleine strukturelle Unterschiede aufweisen und sich in der Tubulin-Interaktion ähnlich verhalten, unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Toxizität und klinischen Aktivität (58, 107). Diese Substanzen spalten in hohen Konzentrationen Mikrotubuli und hemmen in niedrigen Konzentrationen die Tubulinpolymerisation zu MT-Polymeren (58). Durch Sequestrierung von Tubulin-Untereinheiten induzieren sie die Bildung parakristalliner Tubulin-Aggregate, die Reduktion freier Tubulin-Spiegel und die MT-Depolymerisation (1, 6, 58). Dadurch hemmen diese Substanzgruppen die mikrotubuläre Spindelbildung der Inter-, Pro- und Metaphase und blockieren die Mitose (26, 79, 107).

1.7.3 Paclitaxel

Paclitaxel ist ein zyklisches Diterpen, das aus Rinde und Nadeln der pazifischen Eibe gewonnen wird. 1982 entdeckten Horwitz und Mitarbeiter die Wirkung dieser Substanz (26, 55). Durch reversible Bindung an polymerisierte MT fördert Paclitaxel die Bildung anormaler, extrem stabiler, nichtfunktioneller Mikrotubuli aus Tubulin und verhindert gleichzeitig die Depolymerisation der Tubulinfilamente (8, 26, 90, 111). Die Paclitaxel-induzierte Polymerisation der MT erfolgt ohne GTP und MT-assoziierte Proteine, die normalerweise für die MT-Synthese erforderlich sind (55). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen polymerisierten MT und freien Tubulin-Dimeren. Der Mangel an freiem Tubulin hemmt die Bildung neuer funktionsfähiger Mikrotubuli (8, 26, 55). Durch Stabilisierung der MT und die behinderte Neupolymerisation kommt es zur Störung normaler zellulärer Aktivitäten, in welche MT involviert sind, wie z.B. Mitosevorgänge, Aufrechterhaltung von Zellform, Zellbeweglichkeit und Organellentransport (55). Die Substanz wird in Kombination mit anderen Zytostatika z.B. zur Behandlung von Ovarial- und Mammakarzinomen eingesetzt (26, 102).

1.8 Toxine mit direkter oder indirekter Wirkung auf das endotheliale Zytoskelett

Verschiedene Toxine und Substanzen zeigen teils direkte [z.B. Cytochalasin D, *Clostridium difficile* (TcdB-10463)], teils indirekte Wirkung (*Staphylococcus aureus* α -Toxin, H₂O₂, humane neutrophile Elastase) auf das endotheliale Zytoskelett. Alle Substanzen führten in Studien mit Endothelzellen zu einer signifikanten Barrierestörung.

1.8.1 Cytochalasin D

Cytochalasin D, ein Pilzmetabolit der Gruppe der Cytochalasine, wurde mit Erfolg zur Erforschung des Mikrofilaments eingesetzt (11, 13, 15, 123). Cytochalasin-Moleküle binden mit hoher Affinität an das „barbed-end“ der Aktinfilamente und hemmen sowohl die Polymerisation als auch die Depolymerisation des Proteins (11, 13, 15, 114). Am entgegengesetzten „pointed-end“ wird Cytochalasin D nicht gebunden (15). Darüber hinaus führt Cytochalasin D reversibel zu einer passiven Zellretraktion und Zerteilung von Mikrofilamenten in kürzere Abschnitte (15, 51, 124).

1.8.2 Toxin B von *Clostridium difficile*

Toxin B von *Clostridium difficile* (TcdB-10463) ist ein einkettiges 270-kDa Molekül, das über Endozytose in den Zielzellen aufgenommen wird. Innerhalb der Zellen wirkt das Toxin als Enzym, das Rho-Proteine an Threonin 37 durch UDP-Glukosylierung inaktiviert (51, 60, 61). Die kovalente Modifikation führt zu einer Inaktivierung der Rho-Proteinfunktion. Rho-Proteine gehören zur Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine, denen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Mikrofilamentsystems zugeschrieben wird (47, 51, 106). Studien von Hippenstiel und Mitarbeitern zeigten, dass die Hemmung der Rho-Proteine durch TcdB-10463 in Endothelzellen zu einem Verlust von F-Aktin und der Barrierefunktion von Endothelzellen führte (51).

1.8.3 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Staphylococcus aureus α -Toxin ist ein porenbildendes Exotoxin, das in pathogenen Staphylokokkenstämmen vorkommt (31). Es wird als wasserlösliches 3S Molekül sezerniert, das nach Kontakt mit Lipid-Bilayern in die Membran inseriert und

transmembranöse Kanäle bildet (31, 140). Das Toxin stimuliert wahrscheinlich durch Ca^{2+} -Einstrom den kontraktilem Apparat von Endothelzellen und führt zu massiver endothelialer Barriestörung (133). α -Toxin gilt als ein bedeutender pathologischer Faktor der Staphylokokken-Infektion und wird in Zusammenhang mit der Entstehung von akuter pulmonaler Hypertonie und Lungenödem gebracht, welche beim septischen Lungenversagen als gefürchtete Komplikationen auftreten können. Studien von Suttrop und Seeger zeigten, dass das Toxin die Arachidonsäure-Kaskade sowohl in kultivierten Endothelzellen als auch in isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlungen stimuliert (120, 136, 140, 141). In Experimenten mit Kaninchenlungen bewirkte die Substanz eine pulmonalarterielle Hypertension mit Permeabilitätszunahme (120, 136). Suttrop und Mitarbeiter zeigten ferner, dass *Staphylococcus aureus* α -Toxin bei kultivierten Endothelzellen die Permeabilität für Wasser und Albumin erhöhte und diese Veränderungen von interzellulärer Lückenbildung („gaps“) in dem Endothelzellmonolayer begleitet waren (136).

1.8.4 Granulozytäre Wirkstoffe

Im Rahmen akuter Inflammation kommt es zur Aktivierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN), deren Inhaltsstoffe in der Zellmembran und in zytoplasmatischen Granula der antimikrobiellen Verteidigung dienen. Pathogenetisch können aktivierte PMNs aber auch zu einer Bedrohung für den Organismus selbst werden (127). Stimulierte PMNs wurden beispielsweise mit der Entwicklung eines durch endotheliale Permeabilitätszunahme hervorgerufenen Lungenödems in Verbindung gebracht (127, 132). Weitere Untersuchungen zeigten, dass aktivierte PMNs zu schweren Schäden von Lungengewebe und Lungenzellen beitrugen (132, 142). Dabei scheinen für die Pathogenese die Adhäsion der PMN an vaskuläre Endothelzellen und ihre Aktivierung zur Ausschüttung von Sauerstoffmetaboliten und granulozytäre Proteasen wie HNE von Bedeutung zu sein (127, 138). Darüber hinaus

konnte gezeigt werden, dass granuläre Inhaltsstoffe, insbesondere H_2O_2 und Proteasen, zu einer endothelialen Barrierestörung führen (4, 132, 138).

1.8.4.1 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Die Exposition des stark oxidierenden Agens H_2O_2 führte zu einer Vielzahl von Stoffwechselveränderungen in der betroffenen Zelle: es erhöhte den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, schädigte DNA-Stränge und führte zu einem ATP-, cAMP- und NAD-Abfall (110, 132, 154, 155, 156). Weiterhin kam es nach H_2O_2 -Exposition zu einer Proteolyse und zur Hemmung der Glykolyse (110). Darüber hinaus zeigten Studien einen Einfluss von Wasserstoffperoxid auf zytoskelettäre Filamente (4). So demonstrierten Barnard und Malik H_2O_2 -induzierte Permeabilitätszunahmen von Endothelzellmonolayern und die Ausbildung interendothelialer Zellzwischenräume („gaps“). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 durch die Aktivierung von Protein Kinase C zu einer „Aktin-Reorganisation“ und Permeabilitätszunahme führte (4). Andere Untersuchungen zeigten eine deutliche Permeabilitätszunahme gegenüber Wasser und Albumin als Resultat einer oxidativen Endothelzellschädigung durch Destruktion des Zytoskeletts (143, 154).

1.8.4.2 Humane neutrophile Elastase

Humane neutrophile Elastase (HNE) ist im Vergleich zu anderen granulozytären PMN-Proteasen nicht nur anteilig mehr vorhanden, sondern bezüglich ihrer breiten Substratspezifität und Proteolysekinetik wesentlich potenter (138). Dieser Enzymklasse wird ein wesentlicher Beitrag zur Pathogenese der endothelialen Schrankenstörung zugesprochen (93, 127, 133). Während die Effekte von HNE auf endotheliale Permeabilität offensichtlich sind, ist der Mechanismus der HNE-Wirkung weitgehend unverstanden. Es ist unklar, ob HNE rein enzymatisch zur

Endothelzellschädigung mit den konsekutiven Barrierestörungen führt, oder ob die Substanz als Kation-Protein wirkt (93, 138). In Studien zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität unter Verwendung von HNE zeigten sich deutliche Zunahmen der Wasserflussrate und Öffnung von interzellulären Spalten (138).

1.9 Fragestellung

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde der Einfluss der dynamischen zytoskelettären Filamente MT und F-Aktin auf die Regulation der Endothel-Permeabilität untersucht. Es sollen in dieser Arbeit im einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkungen hat die Mikrotubulus-Inhibition auf die endotheliale Barrierefunktion?
2. Welche Zusammenhänge bestehen zwischen MT- und F-Aktin-Systemen? Welche Auswirkung hat die MT-Depolymerisation auf F-Aktin? Welche Rolle spielt das MT-System innerhalb junktionaler Adhäsionskomplexe?
3. Welche Auswirkungen hat die F-Aktin-Hemmung auf Mikrotubulus-Systeme und die endotheliale Barrierefunktion?
4. Welche Aussagen bezüglich des Zytoskeletts (MT, MF) und der endothelialen Barrierefunktion lassen sich nach Stimulation mit Cytochalasin D, *Clostridium difficile* Toxin B-10463, *Staphylococcus aureus* α -Toxin, H₂O₂, und granulozytären Proteasen treffen?

2. Methodik und Material

2.1 Isolation und Kultivierung von pulmonalarteriellen Endothelzellen des Schweins

Die Isolierung von Endothelzellen erfolgte aus Pulmonalarterien frisch geschlachteter Schweine. Hierzu wurde die Herzmuskulatur 2-3 cm unterhalb des Truncus pulmonalis sowie die Arteria pulmonalis in Höhe der Bifurkation durchtrennt. Das präparierte Material wurde, in einem Einmalhandschuh auf Eis gelagert, vom Schlachthof zum Labor transportiert. Nach Ligation der Pulmonalarterien kurz oberhalb der Klappenebene konnten die Aorta ascendens sowie die Ventrikelmuskulatur entfernt werden. Der entstandene Gefäßsack wurde mit sterilem HBSS +/- pH 7,4 mehrfach gespült und in ein Becherglas mit 37°C temperierten HBSS +/- eingehängt. In den Gefäßsack wurde für 15 Minuten 37°C warme steril filtrierte Collagenase (0.05 %) eingefüllt. Die Collagenase wurde danach abpipettiert. Um die aus der Arterienwand abgelösten Zellen aufzunehmen, wurde 37°C warmes Medium 199 (mit Streptomycin 100 mg/l, Penicillin 100000 IE/l und Amphotericin B 1 mg/l) hinzugefügt. Durch 15faches Spülen und vorsichtiges Massieren konnte ein Maximum an Endothelzellen gewonnen werden. Der Inhalt einer Pulmonalarterie wurde auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und zweimal bei 350 g für jeweils 10 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden 19 ml komplettes Medium 199 (mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), Streptomycin 100 mg/l, Penicillin 100000 IE/l und Amphotericin B 1 mg/l) in gelatinierte Zellkulturflaschen (T 75) vorgelegt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das gewonnene Zellpellet in 1 ml des gleichen Mediums resuspendiert und in die T 75-Kulturflaschen überführt. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C mit 95 % steriler Raumluft und 5 % CO₂-Zusatz inkubiert.

Innerhalb von 7-10 Tagen bildete sich am Boden der Zellkulturflaschen eine konfluente Zellschicht. Diese zeigte sich im Phasenkontrastmikroskop bei einhundertfacher Vergrößerung als eine vollständige und gleichmäßige Bedeckung polygonaler Zellen ohne sichtbare Zellzwischenräume. Der konfluente Monolayer wurde nun „gesplittet“, d.h. die Zellen dieser Kultur wurden auf drei neue T 75 Kulturflaschen verteilt. Zunächst erfolgte dazu eine Spülung der Zellen mit 37°C warmen HBSS -/-, pH 7,4. Die Zellen wurden dann unter Trypsingabe durch vorsichtiges Klopfen vom Boden gelöst. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von 37°C warmem Medium mit 10 % FCS und o.g. Antibiotika entstand eine Zellsuspension, die auf drei neue gelatinierte T 75 Kulturflaschen verteilt wurde. Die gewonnenen Zellkulturen wurden als Zellen der zweiten Passage bezeichnet und erneut inkubiert. Dieses Splitting ließ sich jeweils nach Erreichen eines konfluenten Stadiums mehrere Male wiederholen. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurden Zellen der dritten oder vierten Passage verwendet.

2.2 Quantifizierung der endothelialen Permeabilität

2.2.1 Vorbereitung der Polycarbonatfiltermembranen

Vor dem Bepflanzen mit Endothelzellen wurden die Filtermembranen für eine Stunde in 0,2 % Gelatine und für 30 Minuten in 3 % Glutaraldehydlösung gelegt. Anschließend erfolgte für mindestens 60 Minuten eine Sterilisierung der Membranen in 70 % Ethanol. Die sterilisierten Polycarbonatfilter wurden im Brutschrank für maximal 3 Tage gelagert.

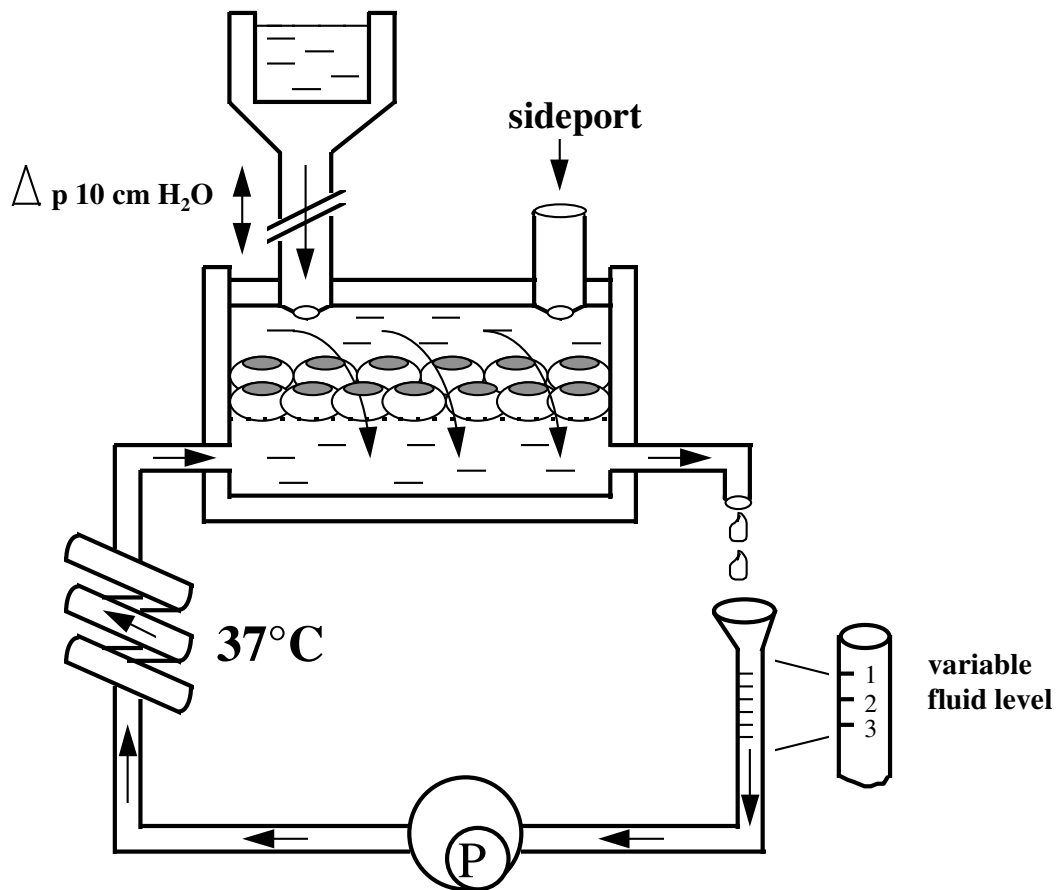
2.2.2 Bepflanzen der Filtermembranen mit Endothelzellen

Jede wie im Kapitel 2.2.1 vorbehandelte Filtermembran wurde in eine Petrischale (\varnothing 6 cm) gelegt, dreimal mit sterilem HBSS -/- gespült und nach dem Entfernen der Pufferlösung unter die Sterilbank zum Trocknen gelegt. Anschließend wurden die Filter zentriert und mit einer heißen Kanüle auf dem Boden der Schale fixiert.

Zum Bepflanzen von fünf Filtermembranen wurden zwei konfluente T 75 Kulturflaschen der zweiten Passage, die aus derselben Zellcharge stammten, verwendet. Zuerst wurde das Kultur-Medium aus den Flaschen abgesaugt und die Zellmonolayer mit HBSS -/- (37°C, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden 3,5 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,035 %, 37°C) in jede Flasche überführt. Unter phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle zeigte sich nach ca. 1 Minute ein Abrunden und Ablösen der Zellen. Durch vorsichtiges Beklopfen der Flaschen lösten sich die Endothelzellen vollständig vom Boden der Kulturflasche ab und gingen in Suspension. Durch Addition von 6 ml Medium 199 mit FCS (10 %), L-Glutamin (100 mg/l), Amphotericin B (1 mg/l), Streptomycin (100 mg/l) und Penicillin (100000 IE/l) wurde die Trypsinwirkung gestoppt. Die Zellsuspension wurde auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment mit 2,5 ml Medium 199 mit obengenannten Zusätzen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun gleichmäßig auf fünf Filtermembranen in den Petrischalen verteilt. Dadurch ergab sich eine Zellkonzentration von ca. 2×10^6 Zellen/Filter. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank hafteten die Endothelzellen an den Filtermembranen an. Anschließend wurde mit 10 ml Medium 199 mit 10 % FCS aufgefüllt. Innerhalb von drei bis vier Tagen entwickelte sich ein konfluenter Endothelzellmonolayer.

2.2.3 Messung der endothelialen Permeabilität

Nach drei bis vier Tagen waren die Endothelzellen auf den Filtermembranen konfluent gewachsen und konnten zur Permeabilitätsmessung in die Versuchsanlage integriert werden. Dazu wurde jeweils eine bewachsene Filtermembran in eine für diese Versuche angefertigte Kammer mittels zweier Gummiringe und einer Plastikscheibe mit Drehgewinde befestigt. Oberhalb des Endothelzellmonolayers befanden sich in der Plastikscheibe zwei Zugänge. Der erste ermöglichte es, unter Verwendung von HBSS +/- pH 7,4, einen kontinuierlichen hydrostatischen Druck von 10 cm Wassersäule auf die Oberfläche des Monolayers einzustellen, während der zweite Zugang den Applikationsort unterschiedlicher Stimulantien bildete. Das Volumen zwischen eingespannter Filtermembran und Plastikscheibe betrug 1 ml. Der Kammerbereich unterhalb des eingespannten Filters war Teil eines halboffenen rezirkulierenden Perfusionssystems mit einem Gesamtvolumen von 10 ml. Dieses wurde mit HBSS +/- pH 7,4 blasenfrei aufgefüllt und mittels eines beheizten Bades auf eine konstante Puffertemperatur von 37°C eingestellt. Mit Hilfe einer Rollerpumpe wurde ein kontinuierlicher Flow von 10 ml/min erzeugt. Das durch den Endothelzellmonolayer filtrierte Volumen addierte sich zu dem Gesamtvolumen und wurde mittels skaliertener Glaskapillare quantifiziert. Ein filtrierte Volumen von 10 µl konnte zuverlässig erkannt werden.



Schema 4: Schematische Darstellung der Versuchsanlage zur Messung endothelialer Permeabilität. Eine mit Endothelzellen bepflanzte Polycarbonatfiltermembran wurde in die Messkammer eingelegt. Über einen Zugang zur luminalen Seite erfolgte die kontinuierliche Applikation eines Druckes von 10 cm Wassersäule. Über ein zweiten Zugang (sideport) wurden die Stimulantien appliziert. Unterhalb der Membran wurde durch eine Rollerpumpe (P) eine Zirkulation von 10 ml Pufferlösung 37°C aufrechterhalten. Die durch die Endothelzell-Filtermembran filtrierte Flüssigkeitsmenge addierte sich messbar zu dem zirkulierenden Gesamtvolumen und konnte an einer skalierten Glaskapillare abgelesen werden.

2.2.4 Versuchsprotokoll für Permeabilitätsmessung

Nach dem Einlegen des Polycarbonatfilters in die Messkammer und nach Integration in das Messsystem wurde der Endothelzellmonolayer einem hydrostatischen Druck

von 10 cm Wassersäule ausgesetzt. Dabei sank die anfänglich hohe Pufferfiltration von zunächst 50-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ innerhalb eines Zeitraums von 10-25 Minuten auf einen Basalwert von weniger als 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ („Sealing“). Dies entsprach einer hydraulischen Konduktivität von $< 0,5 \times 10^{-5} \times \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nach erfolgreichem „Sealing“ der Endothelzellmonolayer wurden die untersuchten Testsubstanzen/Toxine über den zweiten Zugang (Sideport) zugeführt: Colchicin 160 min, Vinblastin/Vincristin 160 min, Paclitaxel 180 min, HNE 90 min, H_2O_2 90 min, TcdB-10463 120 min, Cytochalasin D 80 min und α -Toxin 40 Minuten. Während Colchicin, Vinblastin/Vincristin, Paclitaxel, HNE und H_2O_2 über Druckzulauf infundiert wurden, erfolgte die Zugabe von Cytochalasin D, α -Toxin und TcdB-10463 nur als Bolus. Die Flüssigkeitsstände wurden in 5 Minuten-Intervallen an den kalibrierten Glaskapillaren abgelesen und protokolliert.

Das in jeder Versuchsreihe mitlaufende Kontrollfilter blieb unstimuliert und enthielt die Konzentration an Lösungsmittel, die für die Lösung der Testsubstanzen der anderen Filter notwendig war. Am Ende des Versuchs wurde den Kontrollfiltern *Staphylococcus aureus* α -Toxin zugesetzt, um die Vitalität und Reaktionsfähigkeit der Zellen zu überprüfen. Bei spontanem Ansteigen der Wasserflussrate während der Versuchsdurchführung oder bei Ausbleiben des Permeabilitätsanstiegs nach α -Toxin-Bolusgabe wurden die Versuchsergebnisse nicht gewertet.

2.2.5 Berechnung der hydraulischen Konduktivität

Die hydraulische Konduktivität berechnet sich aus der Filtration (Volumen/Zeit) pro Oberflächeneinheit pro Einheit hydrostatischer Druckdifferenz. Bei dem zuvor erläuterten Modell ergibt sich demnach beispielsweise aus einem filtrierten Volumen von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ eine hydraulische Konduktivität von $4,82 \times 10^{-5} \times \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm} \text{H}_2\text{O}^{-1}$. In diese Berechnung gehen die für die Filtration effektiv zur Verfügung stehende

Fläche von $3,46 \text{ cm}^2$, der hydrostatische Druck von $10 \text{ cm H}_2\text{O}$ und das filtrierte Volumen pro Zeiteinheit ($100 \text{ }\mu\text{l/min}$ entsprechen dabei $0,1 \text{ cm}^3/\text{min}$ bzw. ca. $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{s}$) ein. Damit ergibt sich ein Divisionsfaktor von 20,78 für die Errechnung der hydraulischen Konduktivität aus der Filtrationsrate (51, 136, 133, 143).

2.3 Untersuchung der Morphologie von pulmonalarteriellen Endothelzellen

2.3.1 Bepflanzung von Glass-Chamber-Slides mit Endothelzellen

Für die morphologischen Untersuchungen der Endothelzellen wurden Glasobjektträger verwendet, auf die jeweils acht Kammern mit einem Aufnahmevermögen von je $1000 \text{ }\mu\text{l}$ aufgesetzt waren. Vor dem Bepflanzen mit Pulmonalarterienendothelzellen wurde in die Glass-Chambers-Slides $500 \text{ }\mu\text{l}$ 0,2 %iger Gelatine gegeben und unter der Sterilbank für eine Stunde gelagert.

Zum Bepflanzen von 10 Chamber-Slides wurde eine T 75 Kulturflasche mit Endothelien der zweiten Passage verwendet. Nach zwei Waschgängen mit HBSS -/- und der Zugabe von $3,5 \text{ ml}$ Trypsin wurden, nachdem sich die Zellen von dem Flaschenboden gelöst hatten, 60 ml auf 37°C erwärmtes Kulturmedium M199 (Zusätze wie unter Kap. 2.2.2) hinzugegeben. Anschließend wurden 6 ml der Zellsuspension mit 34 ml M199 in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und auf die Chamber-Slides verteilt. Innerhalb von 2-3 Tagen entwickelten sich im Brutschrank konfluente Endothelzellmonolayer auf den gekammerten Objektträgern.

2.3.2 Doppelimmunfluoreszenz: Untersuchung des Mikrotubulus- und Aktinfilament-Systems pulmonalarterieller Endothelzellen

2.3.2.1 Methodische Grundlagen

Für die Anfärbung des Mikrotubulus-Systems der Endothelzellen wurde die Methodik der indirekten Immunfluoreszenz angewendet (42, 89). Nach Markierung des α -Tubulins mit einem monoklonalen Anti- α -Tubulin-Antikörper der Maus (primärer Antikörper) wurde ein mit Fluoreszein (FITC) gekoppelter sekundärer Anti-Maus IgG-Antikörper der Ziege zugegeben. Der FITC-gekoppelte Antikörper erlaubte die Visualisierung des Mikrotubulussystems im Fluoreszenzmikroskop. (Fluoreszein: Excitation: 495 nm, Emission: 525 nm, Farbe: grün).

Die Methodik zur Darstellung filamentären Aktins basierte auf direkter Immunfluoreszenz. Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, bindet spezifisch an F-Aktin (15, 123). Durch den an Phalloidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) kann filamentäres F-Aktin unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Rhodamin: Excitation: 552 nm; Emission: 570 nm; Farbe: rot).

2.3.2.2 Versuchsdurchführung

Den 2-3 Tage alten Endothelzellkulturen, die auf Glass-Chamber-Slides gewachsen waren, wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn frisches Kulturmedium M199 mit 2 % FCS (weitere Zusätze wie unter Kap. 2.2.2) zugeführt. Am Versuchstag wurden die Endothelzellen zunächst zweimal mit 37°C warmen Medium M199 (Zusätze wie oben beschrieben) gewaschen und im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Nach einer phasenkontrastmikroskopischen Konfluenz-Kontrolle wurden den Zellen die unterschiedlichen Stimuli zugesetzt. Eine Kammer blieb als Kontrollkammer mit dem

entsprechenden Lösungsmittel der zu untersuchenden Testsubstanz unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für zwanzig Minuten mit frisch angesetzten 4 %igen Paraformaldehyd fixiert und für fünf Minuten durch Zugabe von Triton X-100 0,1% bei 4°C permeabilisiert (42, 89).

Nach zwei vorsichtigen Waschschritten mit HBSS -/- pH 7,4 bei Raumtemperatur erfolgte nun für zwanzig Minuten die Absättigung unspezifischer Bindungen mit Hilfe von 2 %igen fettsäurefreien BSA. Der Anti- α -Tubulin Antikörper der Maus wurde in HBSS-/- pH 7,4 und 2 %igen BSA auf eine Konzentration von 1 : 700 verdünnt und die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschgang mit HBSS -/- und 2 %igen BSA wurden nun unter Verdunklung sowohl der zweite Antikörper (1 : 700), ein mit Fluoreszin (FITC) gekoppelter Anti-Maus IgG Antikörper als auch TRITC-Phalloidin in einer Konzentration von 0,175 μ g/ml den Endothelzellen für 30 Minuten zugesetzt.

Nach einem Waschgang mit HBSS-/- pH 7,4 wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Durch die gleichzeitige Gabe von Tubulin- und Aktin-bindenden fluoreszierenden Substanzen und die Möglichkeit, innerhalb des Mikroskopes mit Filtern unterschiedlicher Wellenlängen zu arbeiten, konnte zeitgleich sowohl die Beschaffenheit des Mikrotubulus- als auch des Aktinsystems der eingestellten Vergrößerung beurteilt werden. Die Dokumentation erfolgte mit einer Olympus OM-2 auf Fuji S-400.

2.3.2.3 Filme und Fotos

Die Dokumentation der Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchung von Mikrotubulus- und Mikrofilamenten erfolgte mit einer Olympus OM-2-Kamera auf Fuji S-400. Fotos, die exakt den gleichen Bildausschnitt zeigen, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Außerdem wurden Doppelbelichtungen erstellt, die das

morphologische Verhältnis der beiden zytoskelettären Filamenttypen besonders anschaulich darstellen. Dabei entstand durch positive Farbaddition (grün und rot) eine Gelbfärbung im Bereich von Aktin- und Mikrotubulus-Überlagerungen.

2.4 Fluorometrische Bestimmung von F-Aktin

2.4.1 Methodische Grundlagen

Die quantitative Bestimmung filamentären Aktins wurde fluorospektro-photometrisch, wie bei R.B. Wysolmerski beschrieben und von Suttrop und Mitarbeitern modifiziert (139, 157), durchgeführt. Basis dieser Methode ist die spezifische Bindung von Phalloidin, einem Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, an F-Aktin (15, 123). Durch den an Phalloidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) kann F-Aktin markiert werden. Die Bindung von TRITC-Phalloidin an F-Aktin wird durch Extraktion mit Methanol wieder gelöst. Die Konzentration des extrahierten TRITC-Phalloidin kann im Fluorometer gemessen werden und ist proportional zum endothelialen F-Aktin-Gehalt (15, 123, 139).

2.4.2 Versuchsdurchführung

Für die Bestimmung von F-Aktin fanden konfluente Endothelzellmonolayer in T 25-Kulturflaschen Verwendung. Diese wurden wie in Kap. 2.1 beschrieben isoliert und gesplittet. Vor der Stimulation der Zellen wurden alle T 25 unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Konfluenz untersucht und die Kulturflaschen nummeriert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 37°C warmen H/H+/+ pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden die Kulturflaschen aufgestellt und 2 ml H/H+/+ mit der zu untersuchenden Substanz (Colchicin, Vinblastin) eingefüllt. Mit dem Umdrehen der T 25-Kulturflaschen wurden die Endothelzellmonolayer mit der

Testsubstanz überspült. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmem Stabilitätspuffer-1 (SB1: In Aqua dest.: KCL 5,592 g/l, MgSO₄ 739,44 mg/l, EGTA 380,4 mg/l, Imidazolhydrochlorid 680,8 mg/l, Dithiothreitol 30,84 mg/l pH 7,2) gespült. Nach 10-minütiger Permeabilisierung unter Verwendung von je 2 ml 0,03 %iger Saponinlösung bei Raumtemperatur wurde zweimal vorsichtig mit SB1-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte für 20 Minuten die Fixierung mit frisch zubereiteter 3 % iger Formaldehyd-Lösung in SB1-Puffer bei Raumtemperatur. Die fixierten Zellen wurden mit 0,175 µg/ml TRITC-Phalloidin bei 20°C für 30 Minuten im Dunkeln gefärbt. Nach dreimaligem Spülen mit SB2-Puffer (in SB1-Puffer zusätzlich Aprotinin 10 mg/l, PMSF 17,42 mg/l) wurden jeder Kulturflasche jeweils 2 ml tiefgekühltes Methanol (-20°C) zugesetzt. Die Lagerung der Kulturflaschen bei -20 °C für 12 Stunden führte zur Extraktion des TRITC-Phalloidins. 800 µl Überstand wurde in Eppendorfhütchen pipettiert, mit 8000 g für 10 Minuten zentrifugiert und dann für die Fluoreszenzmessung am Spektrophotofluorometer (Firma AMINCO-BOWMANN) eingesetzt. Jeweils 400 µl Probenvolumen wurden in Mikro-Quarzküvetten bei Wellenlängen von 542 nm (Exzitation) und 563 nm (Emission) gemessen und mittels einer Standardreihe aus TRITC-Phalloidin umgerechnet (1,0-80 ng TRITC-Phalloidin/ml Methanol). Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt des Endothelzellmonolayers bezogen (ng TRITC-Phalloidin/µg Protein).

2.4.3 Bestimmung des Zellproteins

Die Proteinbestimmung wurde anhand der von Bradford (9) beschriebenen Methode mit dem BIO-RAD-PROTEIN-ASSAY durchgeführt. Die durch 0,1%ige Triton X-100 Lösung permeabilisierten Endothelzellmonolayer wurden vom Boden jeder T 25 ausgekratzt und 800 µl der Suspension in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Nach 5 Minuten Zentrifugieren wurden 50 µl des Überstandes mit 750 µl H₂O in Glas-Küvetten gefüllt und mit je 200 µl Farbstoff (BIO-RAD-PROTEIN-ASSAY)

gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Spectrophotometer (UVICON 860) gemessen. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.5 Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)

Zur Gewinnung humaner polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten wurde heparinisiertes Vollblut gesunder Spender auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten geschichtet (127, 138). Die Herstellung des Percoll-Gradienten erfolgte durch Verdünnung mit destilliertem Wasser zu 55 %igem und 69 %igem Percoll. Durch Zugabe von 1,5 molarer NaCl wurde Blutisotonie eingestellt (55ml Percoll + 10ml NaCl + 35 ml Aqua dest. bzw. 69 ml Percoll + 10 ml NaCl + 21 ml Aqua dest.). 4 ml 55 %iger Percoll wurde in Polysterolreagenzröhrchen pipettiert und mit 4 ml 69 %igem Percoll unterschichtet. Anschließend wurde vorsichtig unter Verwendung einer großkalibrigen Kanüle mit Liquemin 25000 IE (ca. 20 IE/ml Blut) heparinisertes Blut aufgeschichtet. Die Röhrchen wurden dann für 25 Minuten bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch verteilten sich die Blutbestandteile auf verschiedene Phasen: Die oberen drei Schichten, bestehend aus Plasma, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und 55 %igem Percoll, wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bis knapp oberhalb der darunterliegenden Granulozyten-Bande abgesaugt. Die Granulozyten wurden mit einer großkalibrigen Kanüle in eine Spritze aufgenommen und in ein mit 37°C erwärmtes H/H +/- pH 7,4 gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Um die noch verbliebenen Percollreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension zweimal mit 37° warmem H/H +/- pH 7,4 durch Zentrifugation für jeweils 10 Minuten bei 180 g gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 37°C warmem Medium RPMI 1640 mit 10 % FCS und L-Glutamin resuspendiert. Nach dem zweiten Waschgang wurden die Zellen erneut in RPMI 1640 resuspendiert und die Granulozytenzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Nährmedium

aufgenommen und bei 37°C für 90 Minuten im Brutschrank gelagert (sog. Erholungsphase). Nach der Erholungsphase wurden die Granulozyten für fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 37°C warmem Medium 199 resuspendiert. Dieser Waschgang wurde dreimal wiederholt, um Serumreste des Nährmediums zu entfernen.

2.5.1 Stimulation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Die gereinigte Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 250 ng PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) stimuliert. Anschließend folgte die Inaktivierung von H₂O₂ durch Zugabe von 10.000 U/ml Katalase. Die mit PMA und Katalase behandelte Medium 199-Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die 30 minütige Inkubationszeit diente dazu, eine maximale Sekretion von granulozytären Proteasen zu erreichen und eventuelle Effekte kurzlebiger O₂-Radikale zu vermeiden. Zur weiteren Aufbereitung des PMN-Überstandes wurde die PMN-Zellsuspension für zwei Minuten bei 560 g zentrifugiert und der Überstand durch Milliporefilter der Größe 0,45 µm, Typ HV filtriert. Anschließend wurden Aliquots (100 µl, 200 µl, 400 µl) des PMN-Überstandes direkt den Endothelzellen zugesetzt und diese für eine Stunde im Brutschrank inkubiert.

2.6 Material

2.6.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

Medium 199: 100 mg/l L-Glutamin und 2,2 g/l Natriumbicarbonat von der Firma Gibco, Karlsruhe. Zugewogen wurden zu 500 ml Medium 500 µg Amphotericin B und 50 mg Streptomycin, 50000 I.E. Penicillin, beide von der Firma Boehringer,

Mannheim. Um ein komplettes Medium zu erhalten, wurden noch 10 % oder 20 % fetales Kälberserum (FCS der Firma Boehringer, Mannheim) zugefügt.

HBSS: (Hanks balanced salt solution) der Firma Gibco, Karlsruhe (KCL 4g/l, KH_2PO_4 0,6 g/l, NaCl 80 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,9 g/l, pH 7,4). Wenn im Text als „+/+“ bezeichnet: mit 1,4 g/l CaCl_2 , 1 g/l MgCl_2 und 1 g/l MgSO_4 . Wenn im Text als „-/-“ bezeichnet : Ohne Kalzium und Magnesium, steril angesetzt.

HEPES: (N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N’-[2-Ethansulfonsäure]) der Firma C. Roth, Karlsruhe, wurde in einer Konzentration von 6 g/l zu HBSS zugesetzt.

PBS: Dulbecco’s phosphat buffered saline, ohne Kalzium und Magnesium (KCL 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,16 g/l), der Firma Gibco, Karlsruhe.

SB1-Puffer (Salt-buffer): In Aqua dest.: KCL 5,592 g/l, MgSO_4 739,44 mg/l, EGTA 380,4 mg/l, Imidazolhydrochlorid 680,8 mg/l, Dithiothreitol 30,84 mg/l
PH 7,2

SB2-Puffer: In SB1-Puffer: Aprotinin 10 mg/l, PMSF 17,42 mg/l

2.6.2 Toxine

Colchicin: Alkaloid von *Colchicum autumnale* von der Firma Calbiochem.

Cytochalasin D: Toxin von *Zygosporium mansonii* von der Firma Sigma, München.

Vinblastin: Alkaloid von *Vinca rosea* von der Firma Sigma, München.

Vincristin: Alkaloid von *Vinca rosea* von der Firma Sigma, München.

Taxol: Taxane Paclitaxel von der Firma Sigma, München.

Staphylococcus aureus α -Toxin: freundlicherweise von Prof. Dr. S. Bhakdi, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, zur Verfügung gestellt.

Clostridium difficile Toxin B-10463: Tox-B wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. v. Eichel-Streiber, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, zur Verfügung gestellt.

2.6.3 Antikörper und fluoreszierende Substanzen

FITC-Antikörper: Anti-Maus IgG (Fab spezifisch), FITC-markierter Ziegen-Anti-Maus-Antikörper der Firma Sigma, München.

Monoklonal Anti-alpha-Tubulin-Antikörper: Maus Ascites Flüssigkeit, Klon Nr: B-5-1-2 der Firma Sigma, München.

TRITC-Phalloidin: mit Tetramethylrhodamin-Isocyanat (TRITC) markiertes Phalloidin von *Amanta phalloides* (MG 1305,6) der Firma Sigma, München.

Monoclonal Anti-Vimentin-Antikörper: Maus Ascites Flüssigkeit, Klon Nr: VIN-4-7-1 der Firma Sigma, München.

2.6.4 Sonstige Reagenzien

Kollagenase (Typ CLS II) wurde von der Firma Worthington Corp., Freehold, NJ (USA), bezogen. Fetales Kälberserum, Trypsin-EDTA und Amphotericin B (250µg/ml) von der Firma Boehringer, Mannheim. Gelatine Typ I vom Schwein, Glutaraldehyd (Grad II, 25 % wässrige Lösung) und H₂O₂ (30 %) wurde von der Firma Sigma, München geliefert. Rinderserumalbumin von der Paesel GmbH, Frankfurt/M.. Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglycol) lieferte die Firma Fluka AG, Buechs/Schweiz. Alle für diese Arbeit verwendeten Substanzen besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad.

2.6.5 Zubehör

Zellkulturflaschen (T 75 und T 25), Petrischalen (6 cm Durchmesser), Glass-Chamber-Slides wurden von der Firma Nunc, Wiesbaden, geliefert.

Polycarbonatfiltermembranen mit dem Durchmesser von 25 mm und der Porengröße von 5 µm wurden von der Firma Millipore, Eschborn, bezogen.

2.6.6 Geräte

Spectrophotometer: UVICON 860 von Fa. Kontron Instruments

Spectrophotofluorometer: Fa. AMINCO Bowmann

Mikroskop 1: Olympus IMT 2 Phasenkontrastmikroskop

Mikroskop 2: Olympus Optical Co, Modell: BH2-RFL-T2 (Fluoreszenz-mikroskop)

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten der Abbildungen zur Permeabilitäts- und F-Aktin-Messung wurden mittels Zweiwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben auf Signifikanz untersucht. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM. Verwendet wurde das Statistikprogramm Graph Pad PRISM der Fa. Graph Pad Software Incorporated San Diego. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie von Mikrotubulus-, Aktin- und Intermediärfilamenten in unstimulierten kultivierten Endothelzellen (Kontrollzellen)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Permeabilitätsverhalten stimulierter pulmonaler Endothelzellen unter Berücksichtigung der Morphologie des Zytoskeletts untersucht. Abb. 1 zeigt die drei zytoskelettären Hauptkomponenten Mikrotubulus-, Mikrofilament- und Intermediärfilament-System (MT, MF, IF) unstimulierter ECs (Kontrollzellen).

Abb. 1-A: Mikrotubuli bilden ein System von Einzelfasern, welche sternförmig von dem paranukleär gelegenen Zentrosom in die Peripherie ausstrahlen. Durch die paranukleäre Lage des MT-Keimbildungszentrums scheint die Verteilung der MT-Filamente optisch unsymmetrisch. Die Hauptausrichtung der Mikrotubulusstrukturen deutet die Zell-Polarität an. Aufgrund der Färbetechnik (indirekte Immunfluoreszenz) werden sowohl filamentäre MT-Strukturen als auch Tubulin-Einzelmoleküle grün angefärbt. Abb.1-B: Endotheliale Aktinfilamente zeigen sich als quervernetzte Geflechte und Bänder, die nahe der Zellmembran lokalisiert sind und ein typisches wabenartiges Relief bilden („peripheral dense bands“). Optisch verleihen die Mikrofilamente der Zelle Form und bilden eine Abgrenzung zu Nachbarzellen. Aufgrund der Färbetechnik (direkte Immunfluoreszenz) sind hierbei im Gegensatz zu der MT-Färbung, bei welcher auch einzelne Tubulinmoleküle angefärbt werden, nur Aktin-Filamente und nicht G-Aktinmoleküle erkennbar. Abb.: 1-C: Neben Mikrotubulus- und F-Aktin-Systemen bilden Intermediärfilamente die dritte zytoskelettäre Hauptkomponente eukaryoter Zellen. Intermediärfilamente (hier Vimentin) sind kräftige und dauerhafte Proteinfilamente, die sich in gleichmässig gebogenen Anordnungen vom Kern bis zum Zellrand erstrecken.

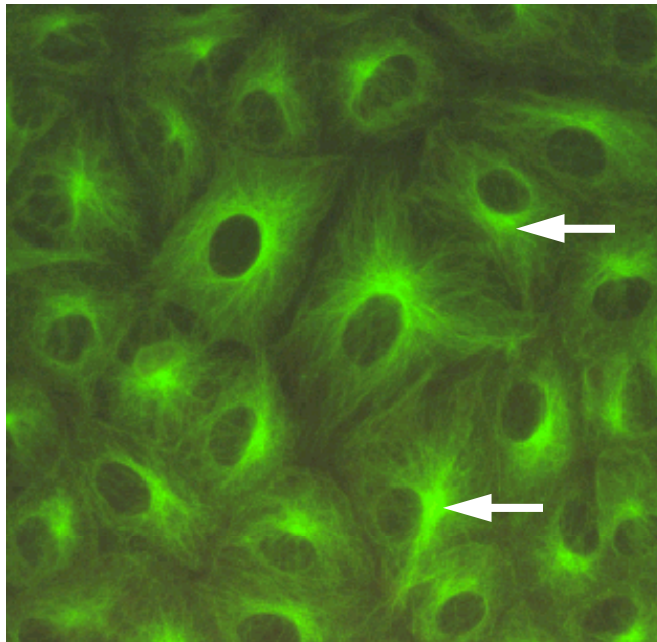


Abb. 1-A: Mikrotubulus-System. Mikrotubuli von ruhenden Endothelzellen sind als System von Einzelfasern zu erkennen, die sternförmig vom paranukleären Zentrosom, dem Mikrotubulus-Keimbildungszentrum (Pfeile), in die Zellperipherie ausstrahlen.

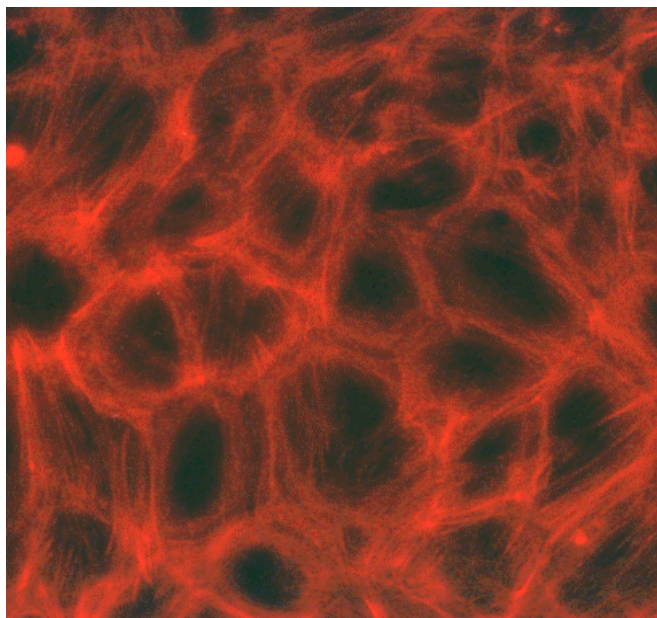


Abb. 1-B: F-Aktin (Mikrofilamente). Aktinfilamente sind Proteinverbindungen, die sich innerhalb des ruhenden Endothelzellverbandes als quervernetzte Geflechte und Bänder darstellen, die, in der Peripherie angeordnet, ein typisches wabenartiges Relief bilden (peripheral dense bands).

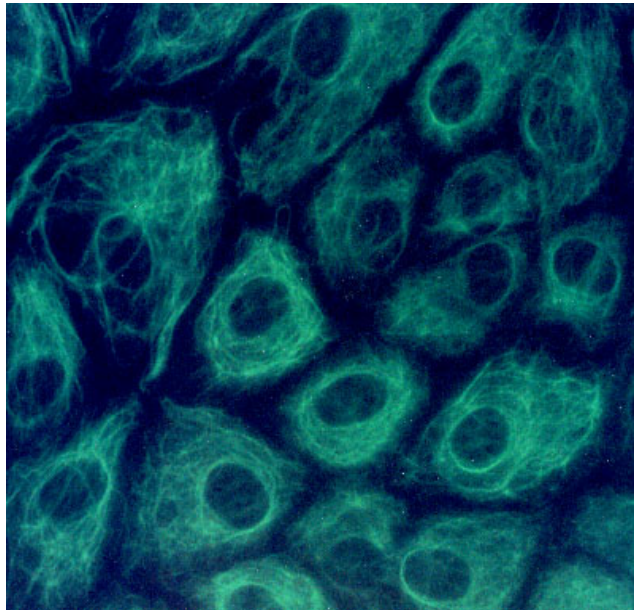


Abb. 1-C: Intermediärfilamente (Vimentin). Intermediärfilamente sind kräftige und dauerhafte Proteinfilamente, die sich in gleichmässig gebogenen Anordnungen vom Kern bis zum Zellrand erstrecken.

3.2 Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch Mikrotubulus-Toxine

3.2.1.1 Colchicin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen

In dieser Experimentreihe wurde die Frage untersucht, ob MT-Hemmung die Barrierefunktion pulmonaler Endothelzellen beeinflussen kann. Colchicin hemmt die MT-Synthese und führt zu einem verstärkten MT-Abbau.

Abb. 2 zeigt die Zunahme der hydraulischen Konduktivität nach Bolus-Gabe und anschließender kontinuierlicher Zufuhr von Colchicin in den Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 100 μM . Colchicin erhöhte die hydraulische Konduktivität geselter Endothelzellmonolayer zeit- und dosisabhängig und führte in vitro zu einer endothelialen Barrierestörung.

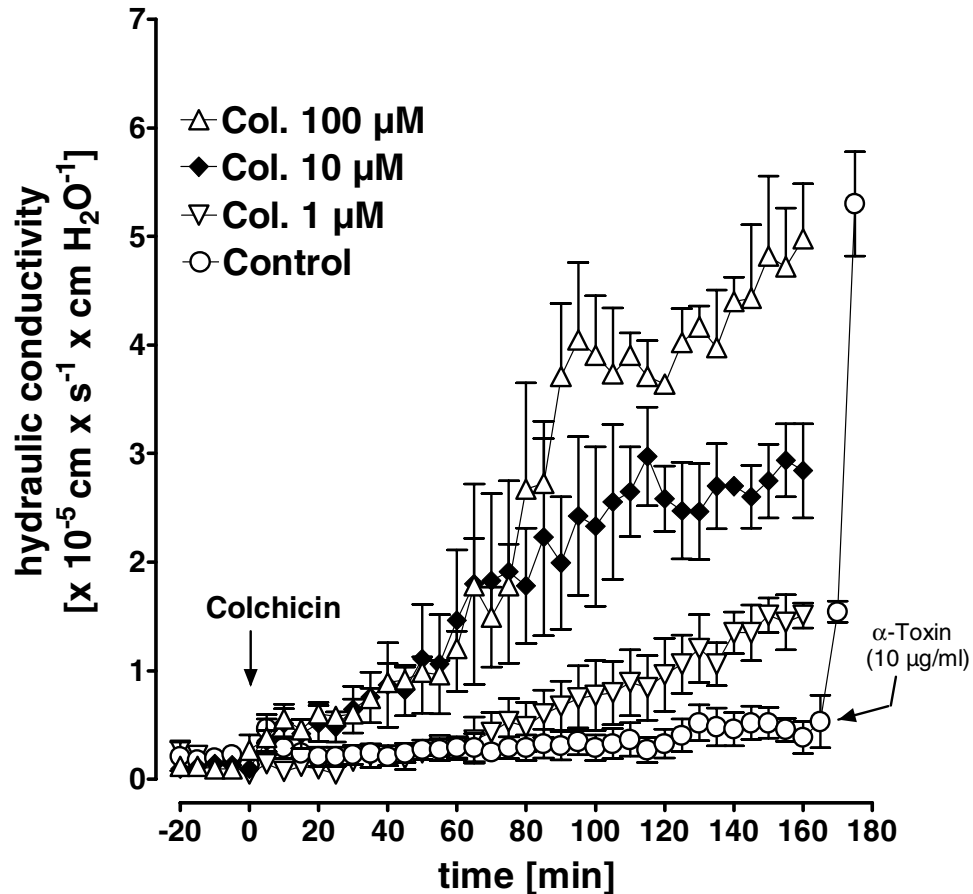


Abb. 2: Zunahme der endothelialen Permeabilität nach Zugabe von Colchicin. Zum Zeitpunkt $t=0$ Min. wurde auf die gesalten Monolayer Colchicin in Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 100 μM für 170 Minuten gegeben. Es zeigte sich ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg der Wasserfiltration. Die Permeabilität ist als hydraulische Konduktivität ($\times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$) aufgezeichnet. Unstimulierte Kontrollfilter blieben im Versuchszeitraum stabil und reagierten prompt auf Perturbation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ *Staphylococcus aureus* α -Toxin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 6 unabhängigen Experimenten.

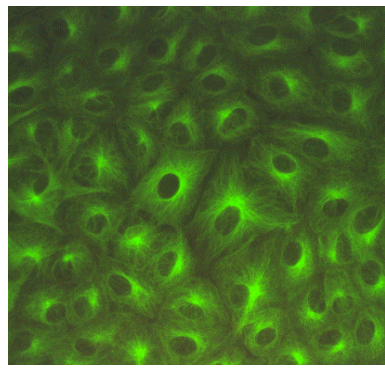
Bei einer Colchicin-Konzentration von 1 μM kam es nach ca. 80 Minuten zu einem langsamen Anstieg der Wasserfiltration, die nach 160 Minuten bis ca. $1,5 \times 10^{-5} \text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ zunahm. Bei höheren Colchicin-Konzentrationen trat der Anstieg früher ein. Nach 160 Minuten lagen die Filtrationswerte der

Monolayer nach 10 μM Colchicinkonzentration bei $2,7 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ und nach 100 μM bei $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Im Vergleich zu den Kontrollzellen entsprach die gemessene Wasserfiltration einer 5-10fachen Permeabilitätszunahme. Unstimulierte Kontrollzellen blieben im gesamten Beobachtungszeitraum stabil und zeigten keine Permeabilitätszunahme. Die Wasserflussrate bei Kontrollzellen betrug dabei weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Die gesalten Kontrollfilter reagierten am Ende der Versuche auf die Gabe von *Staphylococcus aureus* α -Toxin mit deutlicher Permeabilitätszunahme als Zeichen der Vitalität.

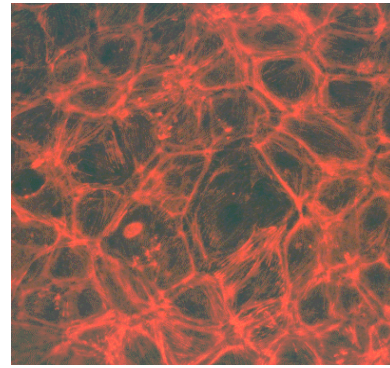
3.2.1.2 MT-Depolymerisation nach Colchicin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und zur endothelialen Zell-Retraktion mit interendothelialer Lückenbildung

Colchicin hemmt die MT-Synthese und führt zu einem MT-Abbau. In dieser Versuchsreihe sollten die morphologischen Auswirkungen von MT-Inhibition auf F-Aktin und Endothelzellen untersucht werden. Das Spindelgift wurde den Endothelzellen in Konzentrationen von 0,1 μM bis 100 μM über einen Zeitraum von 120 Minuten appliziert. Mit zunehmender Colchicin-Konzentration änderte sich sowohl die Mikrotubulus- als auch die Mikrofilament-Morphologie im Vergleich zu den Kontrollzellaufnahmen (Abb. 3). Die Stimulation der Endothelzellen mit 0,1 μM Colchicin führte bereits zu einer leichten Reduktion mikroskopisch erkennbarer Tubulinfilamente (Abb. 3-F). Die Depolymerisation von Mikrotubuluseinheiten und die daraus resultierende Anhäufung von Tubulineinzelmolekülen bewirkten eine diffuse Grünfärbung des Zytoplasmas der Endothelzellen. Das physiologische „Wabenrelief“ der Mikrofilamente blieb nach 0,1 μM Colchicin überwiegend bestehen. Dennoch kam es im Vergleich mit den Kontrollzellen zu diskreten Veränderungen (nicht gezeigt). Es zeigten sich insbesondere leichte zytoplasmatische Verdichtungen des F-Aktins sowie

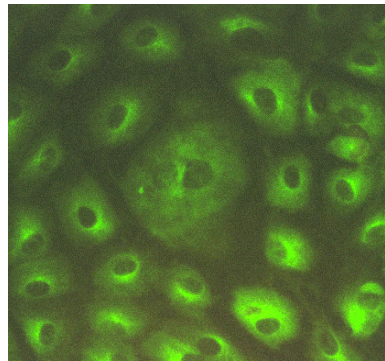
Stressfaserbildungen (Abb. 3-F). Mit zunehmenden Colchicin-Konzentrationen war morphologisch eine verstärkte MT-Depolymerisation festzustellen. Nach 1 μM Colchicin (Abb. 3-C) waren vergleichsweise mit Kontrollzellen deutlich weniger MT-Einzelfasern erkennbar. Die Zentrosomen, die aktiven Zentren der Mikrotubulus-Polymerisation, zeigten sich als kleine asterenartige Gebilde. Das Mikrofilamentsystem (Abb. 3-D) bildete nicht mehr die Form schlanker peripherer Bänder, sondern füllte überwiegend das Zytoplasma der Zellen aus (der Zellkern blieb bei den meisten Zellen abgrenzbar). 1 μM Colchicin führte zu Zellretraktionen mit Auflösungen der sonst kontinuierlichen Verbindungen zwischen Nachbarzellen in Form von interzellulären Spalten und Lücken (vgl. weisse Pfeile in Abb. 3-D). Bei höheren Colchicin-Dosierungen mit 10 μM und 100 μM Colchicin bestätigten sich die beschriebenen Befunde in deutlicherer Ausprägung. Die Endothelzellen zeigten eine allgemeine Retraktion und eine großflächige Auflösung von Zell-Zell-Kontakten. Die Zellverbindungen innerhalb des Monolayers bestanden dabei aus dünnen Zellbrücken, die filamentäres Aktin enthielten (nicht gezeigt). Die MT-Färbungen zeigten gleichmässige von depolymerisierten Tubulineinzelmolekülen angefärbte Zytoplasmata ohne erkennbare MT-Einzelfasern. Die MT-Keimbildungszentren (Zentrosomen) waren auch bei hohen Colchicin-Dosierungen (100 μM) diskret feststellbar. Filamentäres Aktin war in diesen hohen Konzentrationen diffus im gesamten Zytoplasmata verteilt erkennbar (nicht gezeigt).



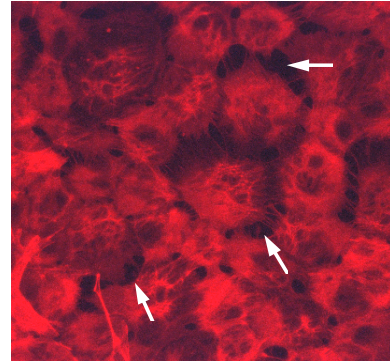
3-A (*)



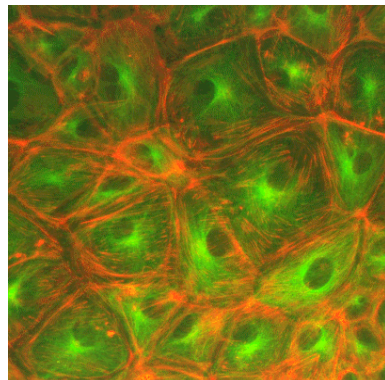
3-B (*)



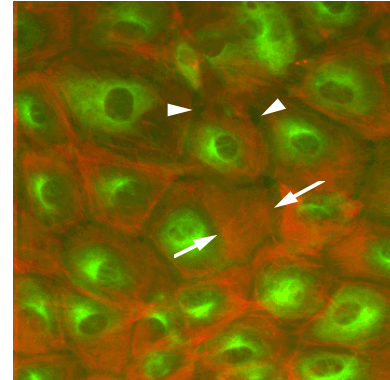
3-C



3-D



3-E



3-F

Abb. 3: Mikrotubulus-und Aktinfilamente nach Stimulation mit Colchicin für 120 Minuten. A-B: unbehandelte Kontrollzellen; C-D: 1 µM Colchicin, D: Zellretraktionen, zytoplasmatische F-Aktinverdichtung und Stressfasern, Pfeile zeigen Gaps; E: Doppelbelichtung von Kontrollzellen; F: Doppelbelichtung 0,1 µM Colchicin: zunehmende MT-Depolymerisation führt zu zytoplasmatischer F-Aktinverteilung (Pfeile) und Zelllückenbildung (Pfeilköpfe); Grüne Färbung: Mikrotubulus-System; Rote Färbung: F-Aktin; (*): Gleicher Bildausschnitt. Typische Ausschnitte aus 4 Versuchen.

3.2.1.3 Colchicin erhöht intrazelluläres F-Aktin

In dieser Versuchsreihe wurde endotheliales F-Aktin nach Colchicinapplikation für einen Zeitraum von 0 bis 120 Minuten fluorometrisch gemessen. Eine Konzentrationsreihe mit 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM Colchicin wurde pulmonalen Endothelzellen zugegeben. 0,1 μM Colchicin (Abb. 4-A) zeigte dabei im Zeitfenster 0-60 Minuten bezogen auf die Kontrollzellen zum Zeitpunkt $t=60$ zunächst einen leichten F-Aktin-Abfall von 4,9 % (von 0,184 auf 0,175 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein). Im weiteren Verlauf wurde ein nicht signifikanter F-Aktinanstieg festgestellt, der näherungsweise dem der Kontrollzellen nach 120 Minuten entsprach. Bei einer Colchicin-Konzentration von 1 μM (Abb. 4-B) stieg der F-Aktinwert im Zeitfenster 60-120 Minuten deutlicher um 11,2 % (von 0,179 auf 0,199 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein). Nach 10 μM Colchicin-Applikation (Abb. 4-C) entwickelte sich kontinuierlich eine leichte F-Aktinzunahme. Nach 60 Minuten wurde ein Anstieg von 7,9 % (von 0,177 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein auf 0,191 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein) und nach 120 Minuten eine signifikante F-Aktinzunahme von 10,9 % (auf 0,195 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein) gemessen. Bei einer Colchicin-Konzentration von 100 μM (Abb. 4-D) konnte über die Versuchsdauer zweimal ein deutlicher F-Aktin-Anstieg gemessen werden. Zunächst stieg der Filamentwert nach 30 Minuten signifikant um 10,2 % (von 0,177 auf 0,195 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein). Nach 60 Minuten wurden 4,5 % F-Aktin-Zunahme gemessen. Nach 90 Minuten erfolgte ein erneuter Anstieg um 9 % (auf 0,193 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein). Nach 120 Minuten wurden 0,187 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein gemessen. Dies entsprach einer F-Aktin-Zunahme von 5,6 %. Die Positivkontrolle unter Zugabe von Cytochalasin D (Abb. 4-D) zum Zeitpunkt $t=0$ Minuten zeigte einen signifikanten F-Aktin-Verlust der Endothelzellen. Der Mikrofilamentanteil fiel nach 30 Minuten von 0,180 $\text{ng}/\mu\text{g}$ Protein auf 0,133 $\text{ng}/\mu\text{g}$ ab. Dies entspricht einem F-Aktin-Verlust von 27,3 %.

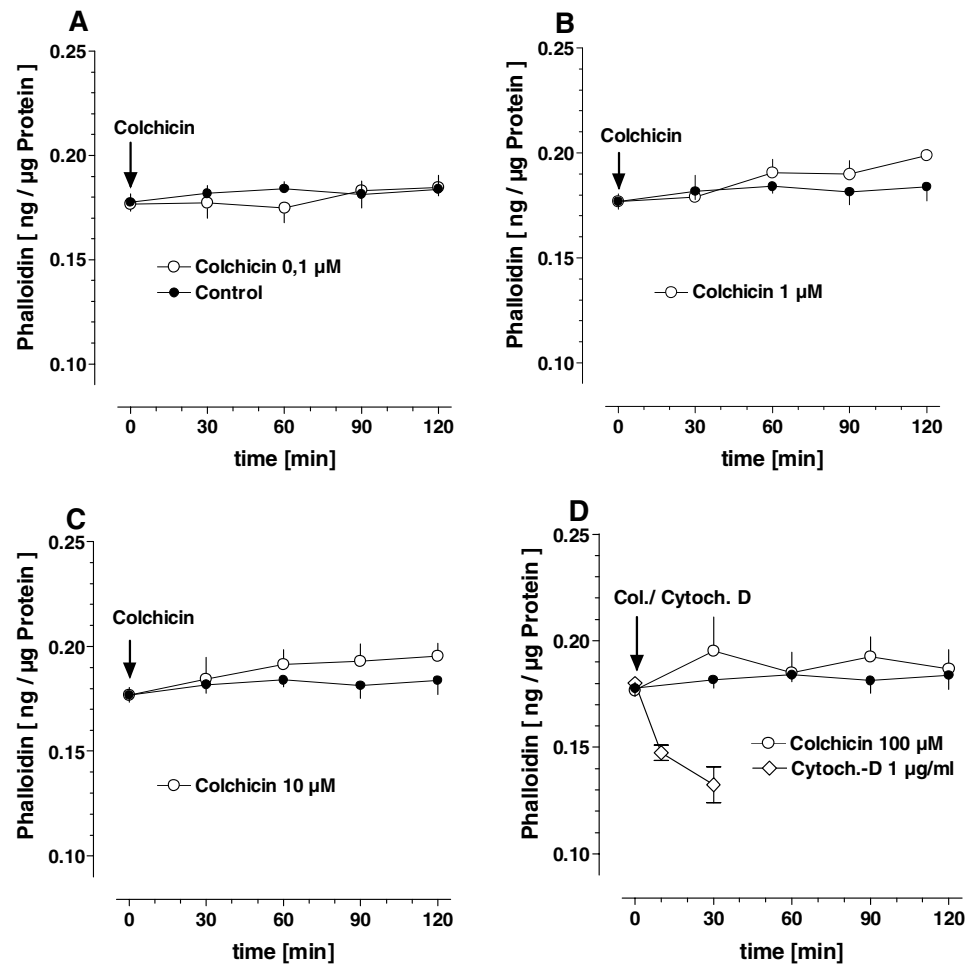


Abb. 4: Konzentrations- und zeitabhängige Veränderung des endothelialen F-Aktin-Gehaltes bei Stimulation mit Colchicin. A: 0,1 μ M; B: 1 μ M; C: 10 μ M; D: 100 μ M und Positivkontrolle Cytochalasin D 1 μ g/ml. - Die Zweifwegvarianzanalyse zeigte einen geringen F-Aktin-Anstieg bei 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Ein signifikanter F-Aktin-Abfall lies sich für Cytochalasin D nachweisen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) aus 4 unabhängigen Versuchen.

3.2.2.1 Vinblastin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen

Vinblastin hemmt in niedriger Dosierung die Polymerisation der MT-Systeme und führt in höherer Dosierung zu einer Zerteilung von MT-Strukturen in parakristalline Aggregate. Es sollte in dieser Versuchsreihe die Auswirkung der MT-Hemmung auf die endotheliale Barrierefunktion getestet werden.

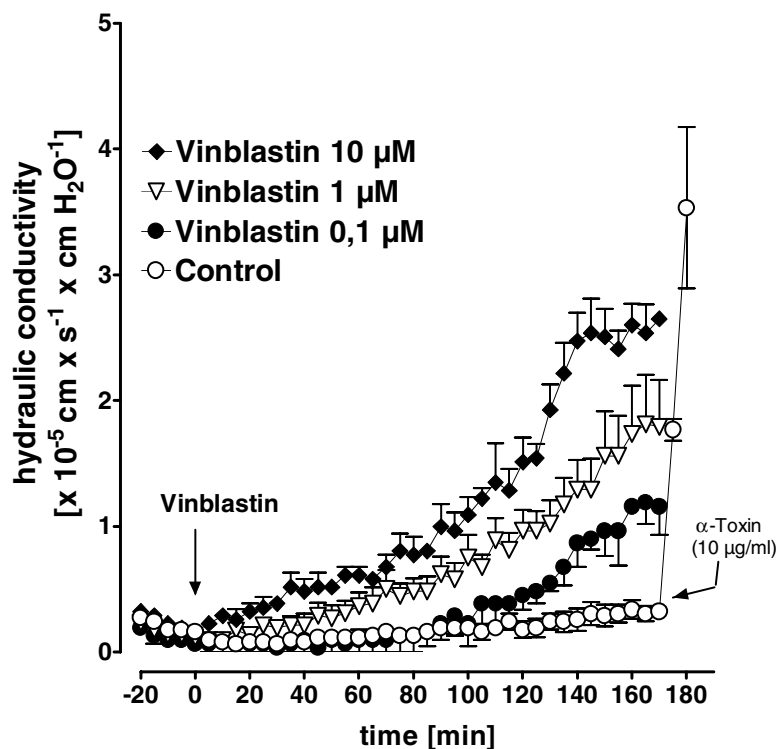


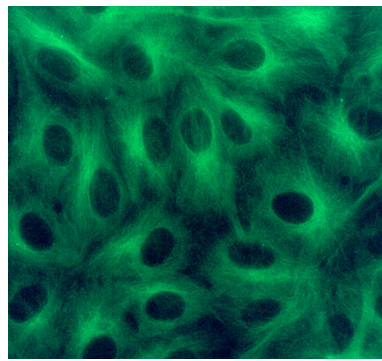
Abb. 5: Permeabilitätszunahme von Endothelzellmonolayer nach Vinblastingabe. Zum Zeitpunkt $t=0$ Min. wurde auf die gesalten Monolayer Vinblastin in Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , und 10 μM als Bolus mit anschließend kontinuierlicher Zuführung für 180 Minuten gegeben. Es zeigte sich ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg der Wasserfiltration nach Vinblastin-Applikation. Kontrollzellmonolayer reagierten prompt mit einem Filtrationsanstieg auf *Staphylococcus aureus* α -Toxin. Die Permeabilität ist als hydraulische Konduktivität ($10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$) aufgezeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 separaten Experimenten.

Abb. 5 zeigt die Zunahme der Wasserflussrate gesalter endothelialer Monolayer nach Bolus-Gabe und anschließender kontinuierlicher Zufuhr von Vinblastin in den Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM und 10 μM . Vinblastin führte dosis- und zeitabhängig zu einer Permeabilitätszunahme der Endothelzellmonolayer. Während bei unbehandelten Kontrollzellen die Wasserfiltration weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ im Untersuchungszeitraum betrug, wurden nach 0,1 μM Vinblastin 1,156-, nach 1 μM 1,7 und nach 10 μM $2,6 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ Wasserflussrate gemessen. Die unstimulierten Kontrollzellfilter blieben über den gesamten Versuchszeitraum stabil und reagierten gegen Ende des Experiments rasch auf die Bolus-Gabe von *Staphylococcus aureus* α -Toxin mit einer massiven Permeabilitätserhöhung.

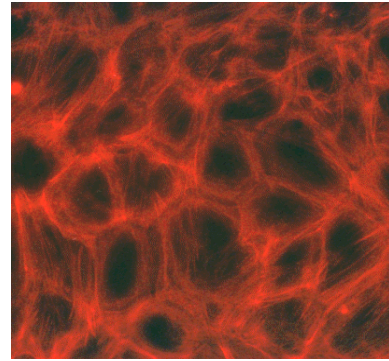
3.2.2.2 MT-Hemmung nach Vinblastin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und endothelialer Retraktion mit interendothelialer Lückenbildung

Die morphologischen Zelluntersuchungen nach MT-Depolymerisation durch Vinblastingabe erfolgten mit der Fragestellung nach Sekundäreffekten auf F-Aktin und die Auswirkung auf das Endothel im Hinblick auf die gemessenen Permeabilitätszunahmen. Vinblastin wurde zur Untersuchung von MT und MF in Konzentrationen von 10 nM bis 100 μM über einen Zeitraum von 120 Minuten appliziert. Mit zunehmender Vinblastin-Konzentration kam es verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 6-A) zu deutlichen Veränderungen des endothelialen Zytoskeletts. Konzentrationen von 10 nM Vinblastin (nicht gezeigt) führten schon zu einer leichten Depolymerisation der MT-Filamente, die in diffuser Grünfärbung der Zytoplasmen erkennbar war. Mikrofilamente zeigten eine geringfügige Verdichtung der Filamente in der Peripherie der Versuchszellen. Nach Stimulation der Endothelzellen mit 0,1 μM

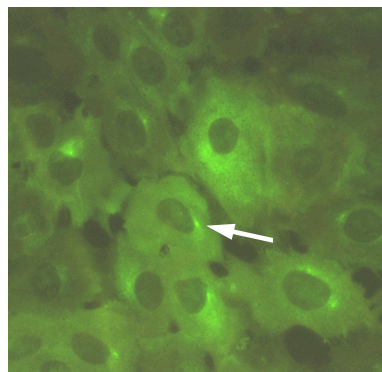
Vinblastin (Abb. 6-C) waren Mikrotubuli in Form struktureller Fasergeflechte nicht mehr erkennbar. Die depolymerisierten Tubulineinzelmoleküle führten zu einer gleichmäßigen Grünfärbung des Zytoplasmas. Die Zentrosomen als aktives MT-Keimbildungszentrum und Hinweis auf MT-Synthese zeigten sich als paranukleare Aufhellung (vgl. Pfeil). Die mikrotubulären Veränderungen nach Applikation von 0,1 μM Vinblastin führten zur verstärkten Umverteilung von F-Aktin (Abb. 6-D). Das Mikrofilamentsystem schien jetzt deutlicher verdichtet und reichte über das gesamte Zytoplasma von der Zellperipherie bis hin zum Nukleus (vgl. Pfeile). Zusätzlich traten vereinzelt interzelluläre Lücken zwischen benachbarten Zellen auf (vgl. Pfeilköpfe). Nach Stimulation mit 1 μM Vinblastin (nicht gezeigt) wurden einzelne, stark fluoreszierende MT-Fragmente, sogenannte parakristalline Aggregate, erkennbar. Mit ansteigender Vinblastinkonzentration (10 μM -100 μM) war eine quantitative Zunahme dieser MT-Aggregate bei gleichzeitiger Größenabnahme festzustellen (Abb. 6-E). Mit zunehmender Depolymerisation von MT-Filamenten verstärkte sich der vorbeschriebene Verlauf für das Mikrofilamentsystem: Diffuse Anfärbung der Zytoplasmen mit F-Aktin, Stressfaserbildung, Loslösung von kontinuierlichen Zell/Zellkontakten mit Lücken-Bildung bei noch weitgehendem Zusammenhalt der Monolayer (0,1 μM Vinblastin), zunehmende Zellretraktionen nach 10- und 100 μM Vinblastin mit deutlicher Gap-Bildung und Interzellulärbrückenbildung (Abb. 6-E). Nach Applikation von 100 μM Vinblastin (Abb. 6-E) war die Ausbildung von parakristallinen Aggregaten mit gleichmässiger Verteilung über das Zytoplasma am stärksten ausgeprägt. Gleichzeitig zeigte sich eine maximale Retraktion der Zellen mit Ausbildung langer mikrofilamentärer Interzellulärbrücken (vgl. Pfeil).



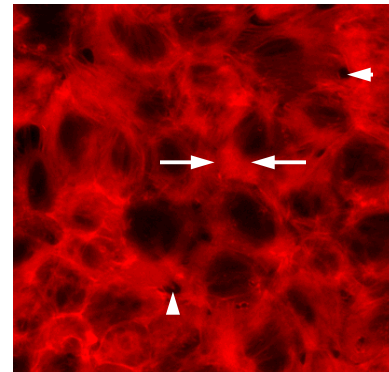
6-A



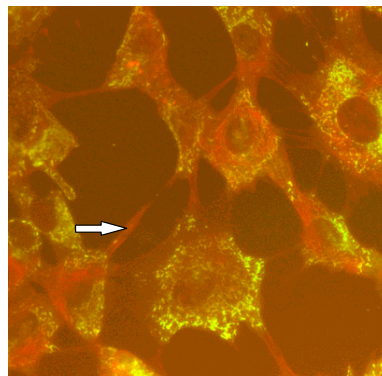
6-B



6-C



6-D



6-E

Abb. 6: Mikrotubulus- und Aktinfilamente nach Stimulation mit Vinblastin für 120 Minuten. A-B: unbehandelte Kontrollen; C-D: 0,1 μ M Vinblastin: C: trotz MT-Depolymerisation werden MT synthetisiert (Pfeil markiert Zentrosom); D: Pfeile markieren F-Aktin-Umverteilung im Zytoplasma; Pfeilköpfe markieren Gap-Bildung. E: 100 μ M Vinblastin: Doppelbelichtung zeigt MT-Depolymerisation mit maximaler Fragmentierung und Zellretraktion mit F-Aktin-Brücken (Pfeil). Grüne Färbung: Mikrotubulus-System; Rote Färbung: F-Aktin. Repräsentative Bildausschnitte aus 5 Versuchen.

3.2.2.3 Vinblastin erhöht intrazelluläres F-Aktin

In dieser Versuchsreihe wurde die Frage untersucht, ob MT-Hemmung durch Vinblastin den intrazellulären F-Aktingehalt beeinflusst. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM erstellt. Vinblastin-Inkubation (1 μM , 10 μM) führte zu einem signifikant erhöhten intraendothelialen F-Aktingehalt. Bei 0,1 μM Vinblastin (Abb. 7-A) zeigte sich über den gesamten Zeitraum eine leichte F-Aktin-Zunahme (nicht signifikant), die im Vergleich zu den Kontrollzellen zwischen 4,4 % und 6 % lag. Bezogen auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ stieg der endotheliale F-Aktin-Gehalt nach 60 Minuten um 8,2 % (von 0,183 ng/ μg Protein auf 0,198 ng/ μg Protein). Nach 90 und 120 Minuten wurden annähernd gleiche Werte gemessen (F-Aktinzunahme bezogen auf $t=0$ nach 90 Minuten: 8,2 %; nach 120 Minuten: 7,6 %). Im Vergleich mit 0,1 μM Vinblastin entwickelte sich nach Stimulation mit 1 μM Vinblastin (Abb. 7-B) ein höherer F-Aktin-Anstieg. Nach 30 Minuten vergrößerte sich der endotheliale F-Aktin-Wert signifikant um 13,1 % (von 0,183 ng/ μg Protein auf 0,207 ng/ μg Protein). Im Zeitfenster 30 bis 120 Minuten stabilisierte sich der F-Aktin-Zuwachs bei 0,208 ng/ μg Protein. Dies entsprach einer Zunahme von 13,7 %. Die Applikation von 10 μM Vinblastin (Abb. 7-C) führte im Vergleich zu allen anderen Konzentrationen zur höchsten filamentären Aktin-Zunahme in den Versuchszellen. Bezogen auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ stieg der Proteinanteil signifikant um 19,1 % (von 0,183 auf 0,218 ng/ μg Protein). Im weiteren Verlauf sank der F-Aktingehalt nach 90 Minuten um 8,7 % (auf 0,199 ng/ μg Protein) und stieg nach 120 Minuten wieder auf einen Wert von 0,204 an, was einer Mikrofilament-Zunahme von 11,4 % entsprach. Bei Applikation von 100 μM Vinblastin (Abb. 7-D) erfolgte zunächst eine leichte F-Aktin-Zunahme um 4,4 % (von 0,183 auf 0,191 ng/ μg Protein) und im Zeitfenster 60 bis 120 Minuten eine F-Aktin-Abnahme, die nach 90 Minuten am stärksten ausgeprägt war. Hier

lag der F-Aktin Gehalt bei 0,175 ng/ μ g Protein. Dies entsprach bezogen auf die Kontrollmessung unstimulierter Endothelzellen zum Zeitpunkt $t=30$ einer F-Aktin-Abnahme von 8,4 %. Nach 120 Minuten erhöhte sich der Mikrofilamentgehalt wieder leicht, blieb jedoch sowohl unter dem F-Aktin-Ausgangswert bei $t=0$ als auch unter der entsprechenden Kontrollmessung unstimulierter Endothelzellen zum Zeitpunkt $t=120$.

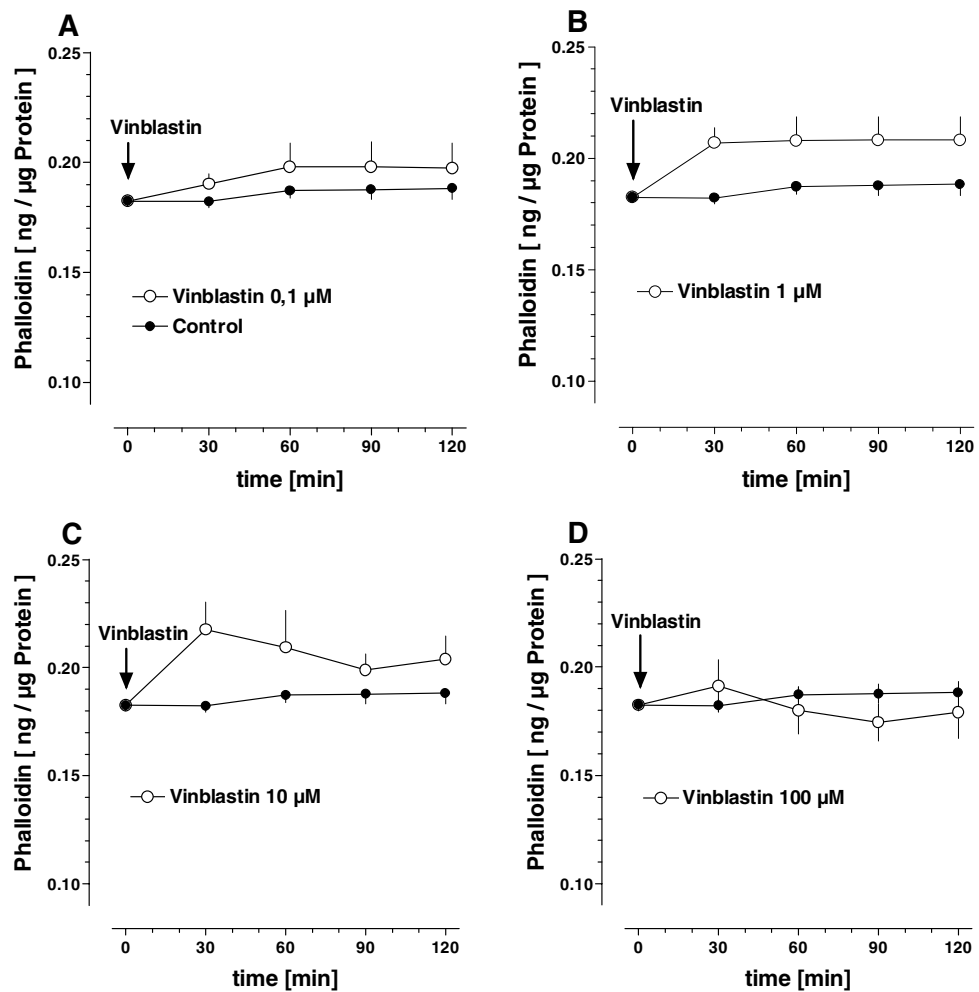


Abb. 7: Konzentrations- und zeitabhängiger Verlauf des endothelialen F-Aktin nach Stimulation mit Vinblastin. A: 0,1 μ M; B: 1 μ M; C: 10 μ M D: 100 μ M. Die Zweifwegvarianzanalyse zeigte einen signifikanten F-Aktin-Anstieg nach 1 μ M und 10 μ M Vinblastin. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) aus 5 separaten Versuchen.

3.2.3.1 Vincristin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen

Ähnlich dem Wirkprofil von Vinblastin hemmt auch Vincristin suffizient die MT-Polymerisation und führt in höheren Konzentrationen zu einer MT-Aufspaltung in parakristalline Aggregate. Abb. 8 zeigt die Zunahme der hydraulischen Konduktivität gesealter endothelialer Monolayer nach Bolus-Gabe und anschließend kontinuierlicher Zufuhr von Vincristin in den Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM und 10 μM .

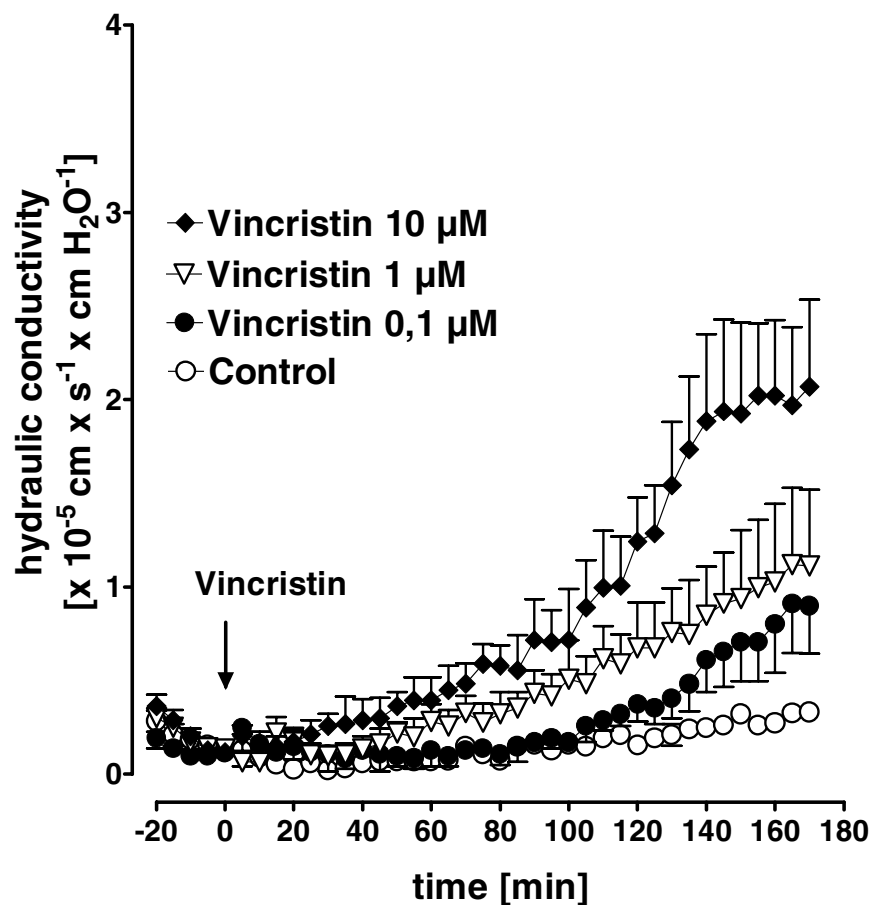


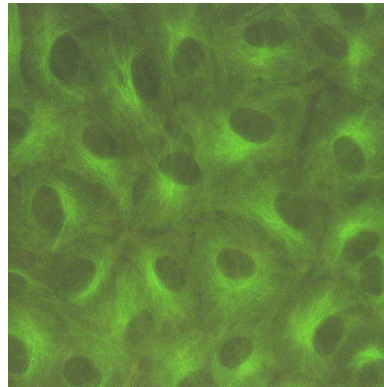
Abb. 8: Permeabilitätszunahme von Endothelzellmonolayer nach Vincristin-Applikation. Zum Zeitpunkt $t=0$ Min. wurde auf die gesealten Monolayer Vincristin in Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , und 10 μM als Bolus mit anschließend kontinuierlicher Zuführung gegeben. Vincristin führte zeit- und dosisabhängig zu einer Zunahme der Wasserflussrate gesealter Endothelzellmonolayer. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SE aus 4 separaten Experimenten.

Vincristin führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Permeabilitätszunahme der Endothelzellmonolayer. Im Untersuchungszeitraum wurden nach Vincristinkonzentrationen von 0,1 μM 0,8, nach 1 μM 1,02 und nach 10 μM 2,03 $\times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ Wasserflussrate gemessen. Die Filtration der unbehandelten Kontrollfilter betrug während des Untersuchungszeitraumes weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$.

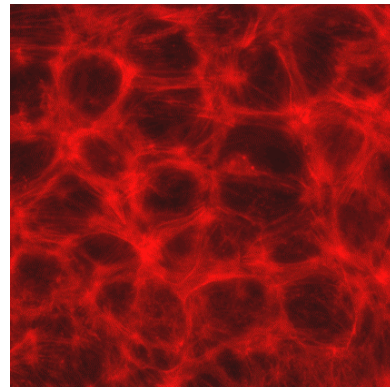
3.2.3.2 MT-Hemmung nach Vincristin-Gabe führt zu einer vermehrten Stressfaserbildung und zur endothelialen Retraktion mit interendothelialen Lücken

Die Endothelzellen wurden mit Vincristin über einen Zeitraum von 120 Minuten in einer Konzentrationsreihe von 10 nM bis 100 μM stimuliert. Bezüglich der Veränderungen des Mikrotubulus-, Mikrofilamentsystems und der Zellmonolayer ähnelten die Resultate im wesentlichen den Ergebnissen nach Stimulation mit Vinblastin (vgl. Kap. 3.2.2.2). Die Stimulation von 10 nM und 0,1 μM Vincristin führte zur Depolymerisation von Mikrotubulus-Einzelfasern und Grünfärbung des Zytoplasmas (nicht gezeigt). Die Ausbildung parakristalliner MT-Aggregate konnte nach Inkubation mit 1 μM Vincristin beobachtet werden (Abb. 9-C). Eine Zunahme dieser fluoreszierenden Fragmente innerhalb der Zelle erfolgte mit weiter ansteigenden Vincristinkonzentrationen. Das Mikrofilamentsystem zeigte nach Stimulation mit 10 nM und 0,1 μM Vincristin im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Umverteilung innerhalb des Zytoplasmas. Dabei verdichteten sich die Aktinfilamente von der Zellperipherie bis hin zum Zellkern. Mit zunehmender MT-Hemmung (0,1 μM und 1 μM Vincristin) bildeten sich interzelluläre Zwischenräume aus (vgl. Abb. 9-D). Nach Zugabe von 10 μM und 100 μM Vincristin kam es zur Ausbildung von Stressfasern, Interzellularlücken bis hin zu ausgeprägten

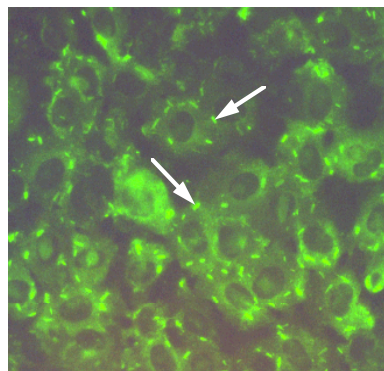
Retraktionen der einzelnen Endothelzellen mit Bildung aktinfilamentärer Interzellularbrücken.



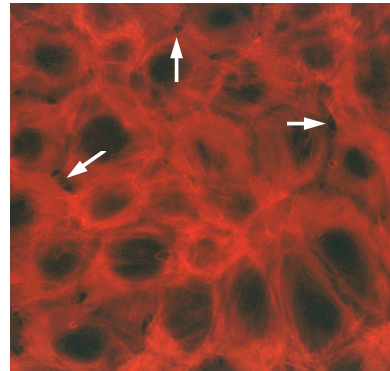
9-A



9-B



9-C



9-D

Abb. 9: Verteilung von Mikrotubulus-und Aktinfilamenten nach Stimulation mit Vincristin über 120 Minuten. A-B: unbehandelte Kontrollen; C-D: 1 μ M Vincristin; C: MT-Depolymerisation mit Ausbildung parakristalliner MT-Aggregate (Pfeile). D: zytoplasmatische F-Aktin-Umverteilung, Pfeile markieren Gap-Bildung. Grüne Färbung: Mikrotubulus-System; Rote Färbung: F-Aktin. Repräsentative Bildausschnitte aus 3 separaten Versuchen.

3.2.4.1 MT-Stabilisation durch Paclitaxel führt zu keiner Permeabilitätszunahme pulmonaler Endothelzellen

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob Mikrotubulus-stabilisierende Agenzien zu einer Veränderung der Barrierefunktion endothelialer Monolayer führen.

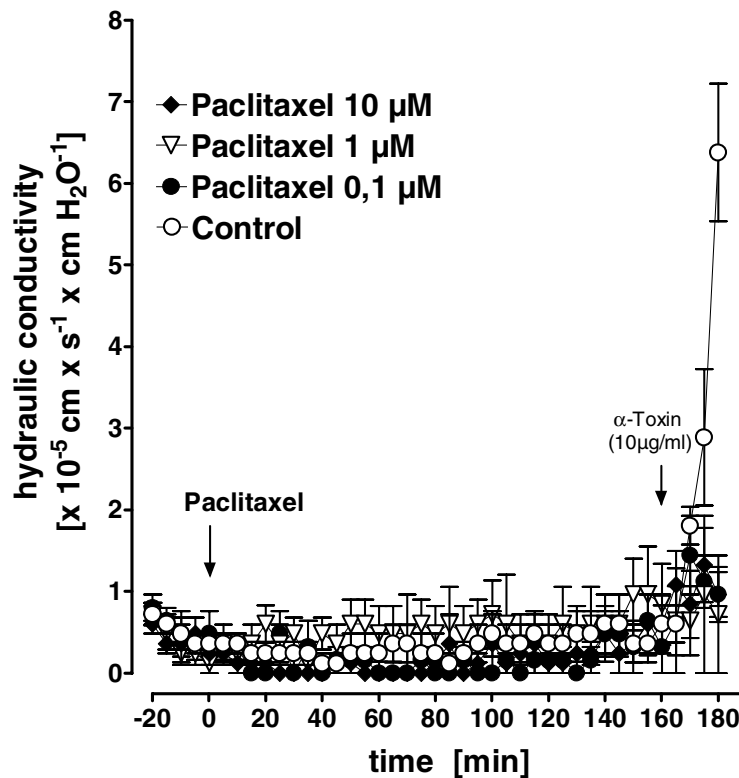


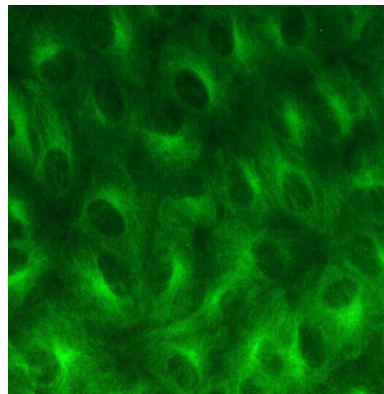
Abb. 10: Permeabilität pulmonaler Endothelzellmonolayer nach Paclitaxel-Exposition. Zum Zeitpunkt $t=0$ Min. wurde auf die gesealten Monolayer Paclitaxel in Konzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, und $10 \mu\text{M}$ als Bolus mit anschließend kontinuierlicher Zuführung gegeben. Paclitaxel führte zu keiner signifikant erhöhten Wasserflussrate pulmonaler Endothelzellmonolayer. Die Filtration der unbehandelten Kontrollfilter betrug während des Untersuchungszeitraumes weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ und die Kontrollzellen reagierten mit einem raschen Filtrationsanstieg auf *Staphylococcus aureus* α -Toxin. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 separaten Experimenten.

Abb. 10 zeigt den Verlauf der Endothelzellpermeabilität nach Paclitaxel-Applikation über einen Beobachtungszeitraum von 180 Minuten. Die Stimulation der Substanz in Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM und 10 μM führte in 6 separaten Experimenten zu keinem signifikanten Anstieg der pulmonalendothelialen Wasserflussrate. 10 μM Paclitaxel führte am Ende des Beobachtungszeitraums zu einer geringen Zunahme der Wasserflussrate bis $1,3 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Die Kontrollzellen blieben über den gesamten Versuchszeitraum stabil und reagierten am Ende des Experiments nach Bolus-Gabe von *Staphylococcus aureus* α -Toxin mit einer Permeabilitätserhöhung.

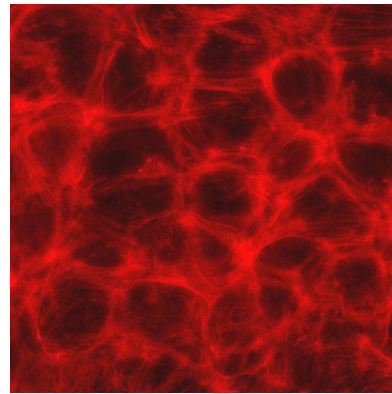
3.2.4.2 Konfluente Endothelzellmonolayer nach MT-Stabilisierung durch Paclitaxel

Bei diesen Experimenten sollte die Frage untersucht werden, ob MT-Stabilisierung zu Sekundärreaktionen des F-Aktins und der Endothelzellen führt. Paclitaxel stabilisiert MT-Systeme durch Bildung anormaler MT und durch Hemmung der MT-Depolymerisation. Bei entstehendem Mangel an freiem Tubulin wird die Bildung neuer funktionsfähiger MT unterdrückt. Paclitaxel wurde zur Untersuchung des Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystems konfluent gewachsener pulmonaler Endothelzellen in Konzentrationen von 10 nM bis 10 μM über einen Zeitraum von 180 Minuten appliziert. Mit ansteigender Konzentration von Paclitaxel kam es zu einer deutlichen Veränderung der filamentären Mikrotubulusstrukturen. Ausgehend vom MT-Organisationszentrum, dem Zentrosom, das deutlich als paranukleäre Aufhellung zu erkennen war, erstreckten sich die filamentären Fasern nach 10 nM Paclitaxel über das gesamte Zytoplasma bis in periphere Bereiche der Zellen. Das Aktinfilamentsystem zeigte nach dieser Paclitaxel-Konzentration keine auffälligen Veränderungen. Die peripher gelegenen schlanken

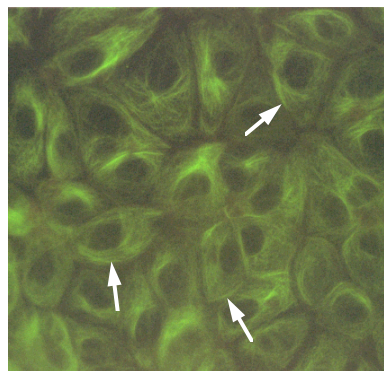
Aktingeflechte der Endothelzellmonolayer waren ähnlich gleichmäßig strukturiert wie die Aktinfilamente der Kontrollzellen. Nach Inkubation von 0,1 μM und 1 μM Paclitaxel (vgl. Abb. 11-C) zeigten einzelne Mikrotubuli eine verdichtete Beschaffenheit und traten dadurch besonders in den Vordergrund. In ungewöhnlich geraden Linien bildeten die „anormalen“ MT unterschiedliche Winkel zueinander und reichten bis zur Zellperipherie (vgl. Pfeile). Die Endothelzellen erhielten daher eine vergleichsweise kantige Gestalt. Zentrosomen waren als paranukleäre Aufhellung als „aktiv“ erkennbar. Mikrofilamente lagen nach dieser Paclitaxel-Konzentration weiterhin als periphere, dichte Bänder in Membrannähe und die Endothelzellmonolayer zeigten konfluente Zellstrukturen ohne interzelluläre Lückenbildungen (vgl. Abb. 11-D). Nach Gabe von 10 μM Paclitaxel war eine „Ordnung“ innerhalb der Mikrotubulusstrukturen nicht mehr erkennbar (nicht gezeigt). Es zeigten sich „Haufen“ von MT-Gruppen über die Zytoplasmen verteilt. Die Endothelzellmonolayer wirkten nach dieser Toxinapplikation etwas unruhiger und unregelmässiger. Das F-Aktinsystem zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen Stressfaserzunahmen bei einem überwiegend konfluenten Endothelzellverband.



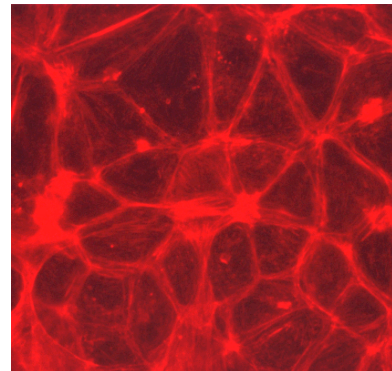
11-A



11-B



11-C (*)



11-D (*)

Abb. 11: Mikrotubulus- und Aktinfilamente nach Stimulation mit Paclitaxel über 180 Minuten. A-B: unstimulierte Kontrollzellen; C-D: 1 μ M Paclitaxel; C: Pfeile markieren anormale MT in der Zellperipherie. D: Trotz anormaler MT-Struktur zeigten sich konfluente EC-Monolayer. Grüne Färbung: Mikrotubulus-Systeme; Rote Färbung: F-Aktin. (*): identischer Bildausschnitt. Repräsentative Bildausschnitte aus 3 separaten Experimenten.

3.3 Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch granulozytäre Wirkstoffe

3.3.1 HNE und H_2O_2 erhöhen die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen

Abb.12 zeigt die Zunahme der hydraulischen Konduktivität gesealter endothelialer Monolayer nach Bolusgabe und anschließend kontinuierlicher Zufuhr von humaner neutrophiler Elastase und 1 mM H_2O_2 .

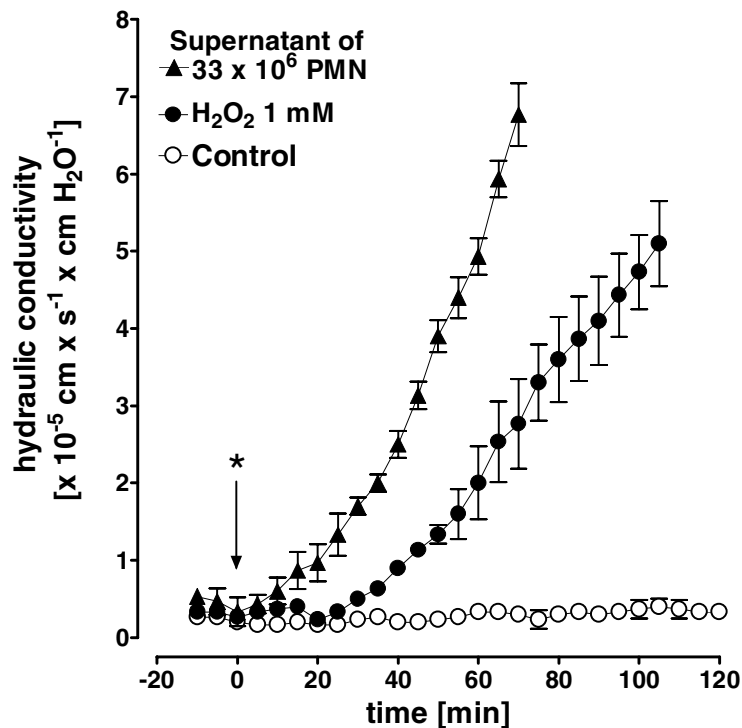


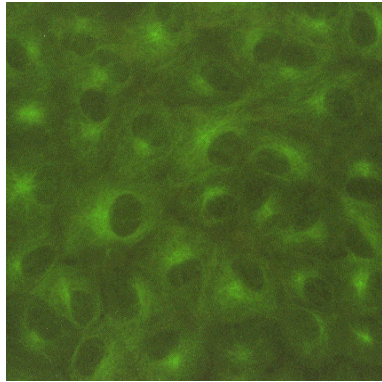
Abb. 12: Endotheliale Barrierefunktion nach Applikation von humaner neutrophiler Elastase und H_2O_2 . Pulmonalarterielle Endothelzellen reagierten nach Stimulation mit proteasehaltigen Überständen (HNE) von 33×10^6 polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und 1 mM H_2O_2 mit signifikanten Zunahmen der Wasserflussrate. (*) kennzeichnet die Boluszugabe zum Zeitpunkt $t=0$ Minuten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 separaten Experimenten.

Bei beiden granulozytären Wirkstoffen zeigte sich im Versuchszeitraum zwischen 30 und 60 Minuten eine deutliche Barrierestörung der Endothelzellmonolayer. Nach ca. 70 Minuten führte die Stimulation von HNE zu einer signifikanten Zunahme der Wasserflussrate bis $6,8 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Im Untersuchungszeitraum von 100 Minuten konnte nach Zugabe von 1 mM H_2O_2 $5,1 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ Wasserflussrate gemessen werden. Die Filtration der unbehandelten Kontrollfilter betrug während des Untersuchungszeitraumes weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$.

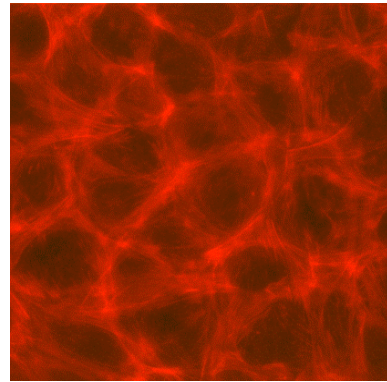
3.3.2 Zellretraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung nach Applikation humaner neutrophiler Elastase

Proteasehaltige PMN-Überstände (vgl. Kap. 2.5.1) wurden zur Untersuchung der Mikrotubulus- und Mikrofilament-Strukturen für 120 Minuten in den Mengen 100 μl , 200 μl und 400 μl auf die Endothelzellen gegeben. Morphologisch waren nach Stimulation mit granulozytären Proteasen keine eindeutigen Veränderungen des Mikrotubulussystems der Endothelzellen erkennbar (vgl. Abb. 13-C). Die MT-Strukturen zeigten nach Inkubation mit allen drei proteasehaltigen PMN-Überständen feingliedrige filamentäre Fasern, die vom paranukleär gelegenen Zentrosom in die Zellperipherie ausstrahlten. Das Zytoplasma der Zellen zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen (vgl. Abb. 13-A) eine etwas stärkere Grünfärbung als Hinweis für eine MT-Neusynthese. Exposition von Endothelzellen gegenüber proteasehaltigen PMN-Überständen führte konzentrationsabhängig zu Veränderungen des Mikrofilament-Systems. Nach 100 μl PMN-Überstand war eine Verdichtung der Aktinfilamente im gesamten Zytoplasma erkennbar (nicht gezeigt). Stressfaserbildung und Zellretraktionen führten vereinzelt zu Lückenbildung zwischen Nachbarzellen. Nach Stimulation mit 200 μl und 400 μl (vgl. Abb. 13-D) des PMN-Überstandes kam es im Endothelzellmonolayer zu ausgedehnter Stressfaserbildung (vgl. Pfeile) und verstärkter Zellretraktion mit interzellulärer

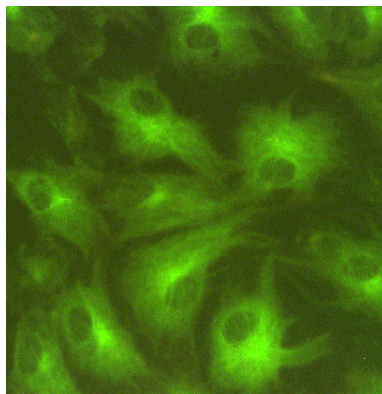
Gap-Bildung. An einigen Stellen entstanden größere Lücken zwischen Nachbarzellen (vgl. Sterne). Zusätzlich waren vermehrt F-Aktin-Fragmentierungen erkennbar (vgl. Pfeilköpfe).



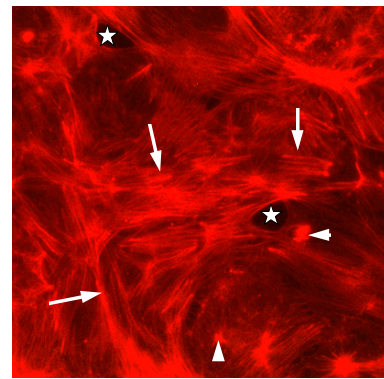
13-A



13-B



13-C (*)



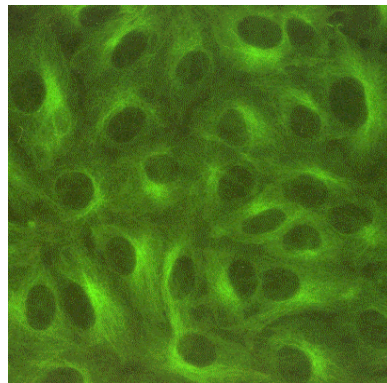
13-D (*)

Abb. 13: Mikrotubulus- und Aktinfilamente nach Stimulation mit proteasehaltigen PMN-Überständen für 120 Minuten. A-B: unstimulierte Kontrollzellen; C-D: 400 µl PMN-Überstand: D: Sterne markieren Zelllücken; Pfeile zeigen F-Aktin-Stressfasern, Pfeilköpfe demonstrieren F-Aktin-Fragmentierung. Grüne Färbung zeigt MT-Systeme, die rote Färbung zeigt F-Aktin. Typische Bildausschnitte aus 2 unabhängigen Versuchen. (*): identischer Bildausschnitt.

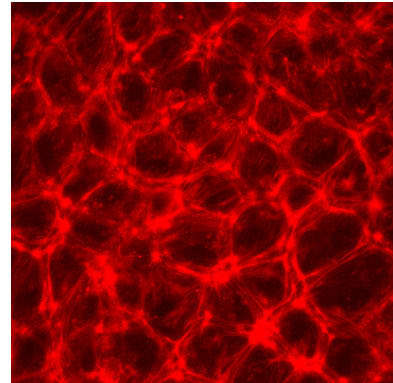
3.3.3 Zellretraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung nach H₂O₂-Applikation

Pulmonale Endothelzellen wurden zur Untersuchung des Mikrotubulus- und Mikrofilament-Systems für 120 Minuten mit H₂O₂ in den Konzentrationen 10 µM, 100 µM und 1 mM stimuliert. Nach Applikation von 10 µM H₂O₂ (vgl. Abb. 14-C) zeigten sich keine eindeutigen Veränderungen der MT-Strukturen. Zentrosomen und filamentäre MT-Strukturen waren erkennbar. Die MT-Systeme wirkten aber ungleichmässig ausgebildet. Die Zytoplasmen zeigten eine stärkere Grünfärbung, hinweisend auf eine beginnende MT-Depolymerisation oder eine verstärkte Neusynthese von Tubulinmolekülen. Aktinfilamente, die sich in der Kontrollzellaufnahme als periphere Geflechte schlanker Bänder darstellten, verdichteten sich nach der Stimulation mit 10 µM H₂O₂ im Zytoplasma und bildeten massiv Stressfasern aus (Abb. 14-D). Außerdem kam es lokal zu Zellretraktionen mit Bildung kleinerer interzellulärer Lücken (vgl. Pfeile). Nach 100 µM H₂O₂-Exposition (nicht gezeigt) zeigten filamentäre Mikrotubuli nicht mehr die typische feingliedrige MT-Ausrichtung, sondern wirkten in ihrer Morphologie in den einzelnen Zellen ungerichtet und unpolar. Darüber hinaus war eine diffuse Grünfärbung des Endothels festzustellen, welche auf eine verstärkte MT-Depolymerisation oder Neusynthese hinwies. Die Zentrosomen waren an wenigen Stellen noch diskret erkennbar. 1 mM H₂O₂ führte zu ausgedehnten MT-Verlusten mit deutlichem Verblässen der Immunfluoreszenz-Färbung möglicherweise infolge Proteolyse (nicht gezeigt). Das Zytoplasma dieser Zellen wirkte daher vergleichsweise blass und war von griesartigen Einschlüssen durchsetzt. Zentrosomen waren hierbei nicht mehr zu erkennen. F-Aktin wurden nach Stimulation mit 100 µM und 1 mM H₂O₂ deutlich verändert. Es zeigten sich Zelllücken ohne Stressfaserbildung. In der höheren Dosierung konnten MF-Anteile nicht mehr angefärbt werden. Die ursprüngliche Wabenstruktur der peripheren Aktinbänder war bei wenigen Zellen nur noch rudimentär erkennbar. Der Endothelzellmonolayer war nicht

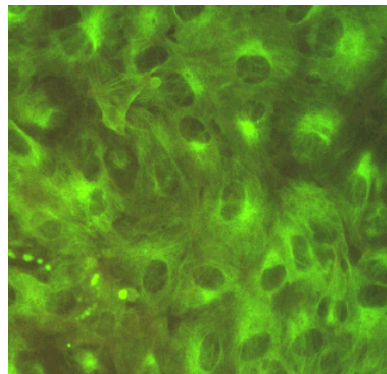
mehr konfluent. Es zeigten sich größere Lücken zwischen den Zellen (nicht gezeigt).



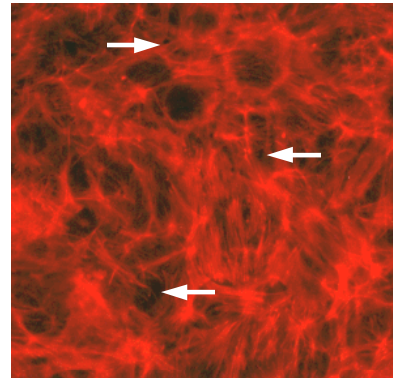
14-A



14-B



14-C (*)



14-D (*)

Abb. 14: Mikrotubulus- und Aktinfilamente nach Stimulation mit H_2O_2 für 120 Minuten. A-B: unbehandelte Kontrollzellen; C-D: 10 μM , C: MT ungleichmässig angeordnet, Zytoplasma-Grünfärbung bei MT-Depolymerisation oder MT-Neusynthese; D: massive Stressfaserbildung, Pfeile markieren Gaps; Grüne Färbung: Mikrotubulus-System; Rote Färbung: F-Aktin. (*): identischer Bildausschnitt. Repräsentative Bildausschnitte aus 3 separaten Versuchen.

3.4 Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch F-Aktin-wirksame Toxine

3.4.1 Cytochalasin D und *Clostridium difficile*-Toxin B-10463: Massive Permeabilitätszunahmen pulmonaler Endothelzellen

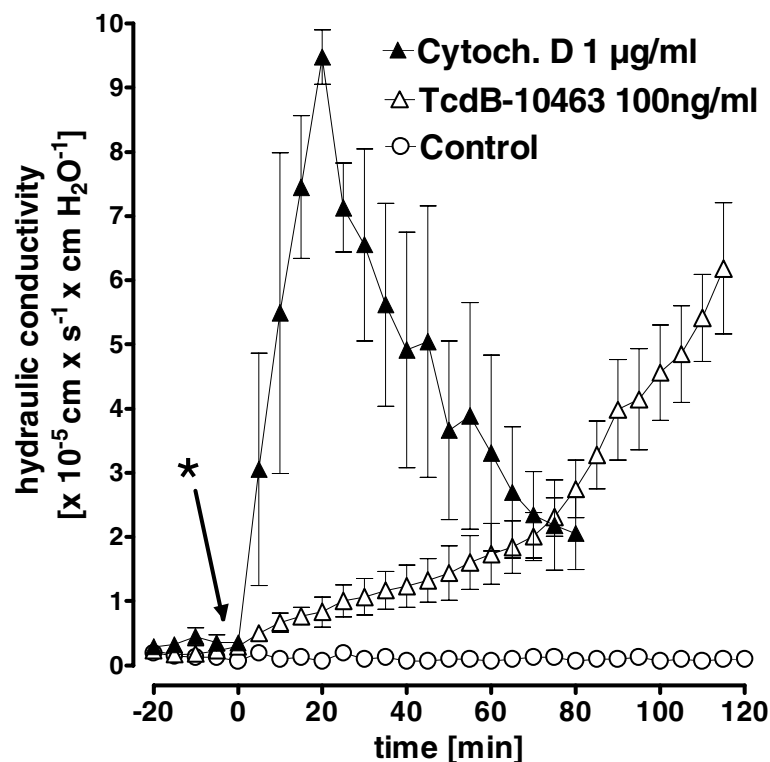


Abb. 15 Permeabilitätszunahme pulmonaler Endothelien nach Bolus-Zugabe von Cytochalasin D und *Clostridium difficile*-Toxin B. (*) kennzeichnet Boluszugabe zum Zeitpunkt t=0 Minuten. Zum Zeitpunkt t=0 wurde auf die gesealten Monolayer 1µg/ml CD und 100 ng/ml TcdB-10463 als Bolus gegeben. Es zeigte sich bei CD ein rascher und reversibler Anstieg der Permeabilität mit einem Maximum nach 20 Minuten und im weiteren Verlauf eine stetig abfallende hydraulische Konduktivität. 100 ng/ml TcdB-10463 führte zu einer kontinuierlichen, signifikanten Zunahme der Wasserflussrate. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 separaten Experimenten.

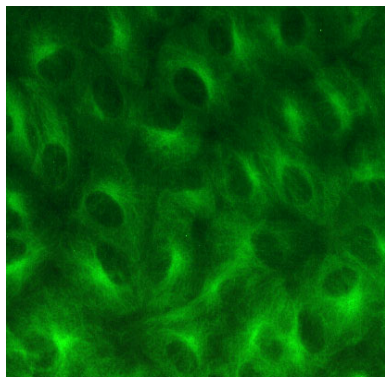
Der Pilzmetabolit Cytochalasin D bindet mit hoher Affinität reversibel an Aktin-Filamente und führt zu ihrer Zerteilung in kürzere Fragmente. Nach Bolus-Applikation von 1 µg/ml Cytochalasin D zeigte sich ein rascher Zuwachs der Wasserflussrate gesalter Endothelzellen. Nach 20 Minuten wurden Höchstwerte der Filtration bis $9,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ gemessen, die sich im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführung deutlich zurückbildeten.

Clostridium difficile-Toxin B-10463 führt durch Hemmung von Rho-Proteinen zu einem F-Aktinverlust in Endothelzellen. Nach 100 ng/ml ToxB-10463 Bolus-Applikation zeigte sich im Versuchszeitraum zwischen 30 und 60 Minuten eine signifikante Barrierestörung der Endothelzellmonolayer. Nach ca. 120 Minuten der Toxin-Stimulation lag die Wasserflussrate bei ca. $6 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$. Die Filtration der unbehandelten Kontrollfilter betrug während des Untersuchungs-zeitraumes weniger als $0,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$.

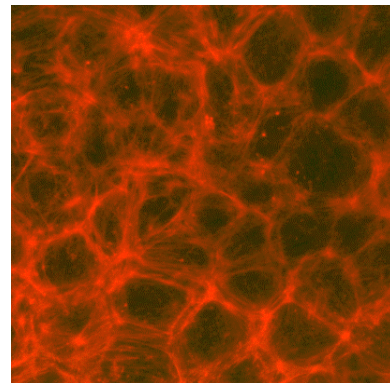
3.4.1.1 Intakte MT-Systeme bilden interzelluläre Verbindungen bei massiver Cytochalasin D-induzierter F-Aktin-Fragmentierung

Zur Untersuchung des MT- und MF-Systems wurde Cytochalasin D pulmonalen Endothelzellen für 30 Minuten in den Konzentrationen 0,5 µg, 1 µg und 2 µg appliziert. Cytochalasin D führte durch eine ausgeprägte F-Aktin-Fragmentierung zu deutlichen Formveränderungen von Endothelzellen und endothelialen Monolayern. Wie in Abb. 16-C gezeigt führte die Substanz zu keinem Abbau von MT-Strukturen. Morphologisch intakte filamentäre MT-Strukturen konnten nach allen Cytochalasin D-Konzentrationen beobachtet werden (vgl. Abb. 16-E). Ebenso wurden auch beginnende Zellteilungen mit Ausbildung morphologisch intakter Mitosespindeln gesehen (hier nicht gezeigt). Aufgrund der durch massive F-Aktinfragmentierungen entstandenen Zellretraktionen zeigten sich ungewöhnliche Zellformen. Durch ihre deutlich

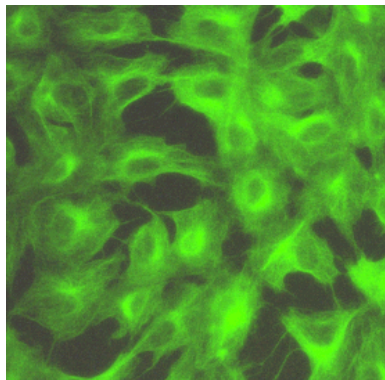
retrahierten Zellkörper und lang ausgestreckten Zellbrücken erinnerten diese an Nervenzellen. Mikrotubulusfilamente fanden sich dabei sowohl sternförmig in die Zellperipherie ausstrahlend als auch in komprimierter Form in den länglichen Zellbrücken, die Kontakte zu den Nachbarzellen bildeten. Bei solchen interzellulären Verbindungen konnten F-Aktinfragmente als „Bindeglied“ zwischen interzellulären MT-Verbindungen beobachtet werden. Die Doppelbelichtung in Abb. 16-G zeigt Mikrotubulus-Brücken, die nur an solchen Stellen der Nachbarzellen binden, wo Aktinfragmente lokalisiert sind. Cytochalasin D führte, wie oben beschrieben, zu einer massiven Fragmentierung des F-Aktinsystems (Abb. 16-D, 16-F). Nach Inkubation der Monolayer mit 0,5 μg , 1 μg und 2 μg Cytochalasin D war die für ruhende Endothelzellen typische wabenartige Aktinstruktur (Abb. 16-B) nicht mehr festzustellen. Die F-Aktinfragmente verteilten sich dabei scheinbar ungeordnet über das Zytoplasma der Endothelzellen. Kontinuierliche Zell-Zell-Kontakte waren unterbrochen und große interzelluläre Spalten und Lücken zu beobachten.



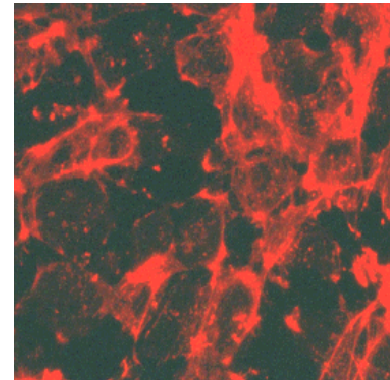
16-A



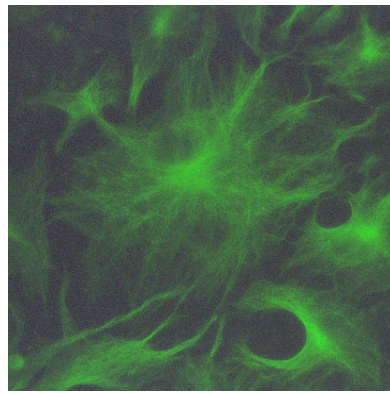
16-B



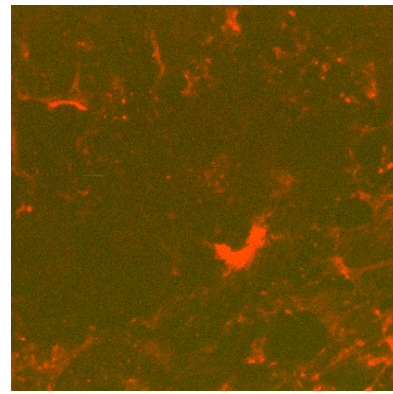
16-C (*)



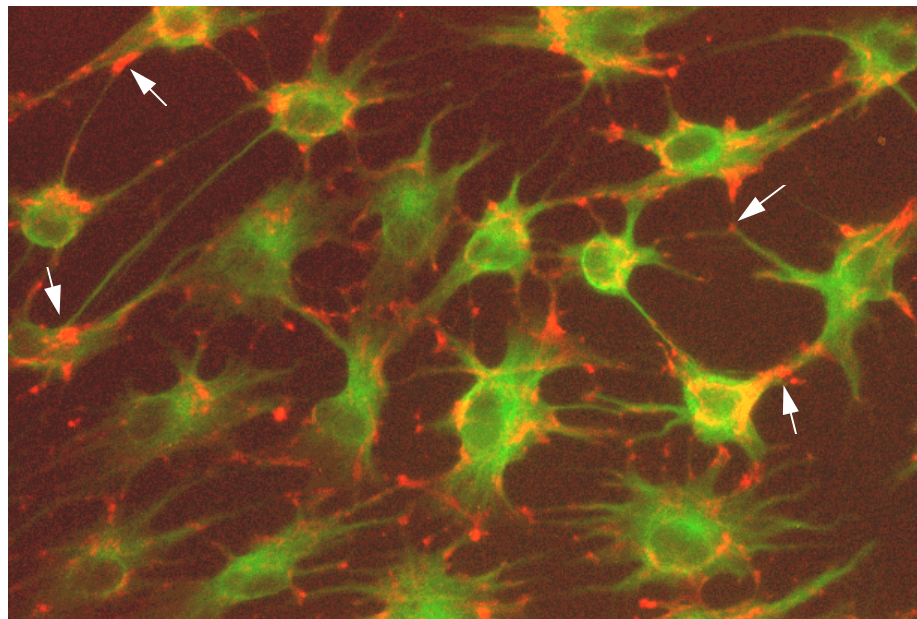
16-D (*)



16-E (*)



16-F (*)



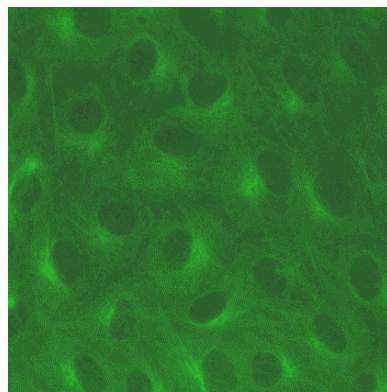
16-G

Abb. 16: Mikrotubulus- und Aktin-Filamente nach Stimulation mit Cytochalasin D für 30 Minuten. A-B: unstimulierte Kontrollzellen; C-D: 0,5 μg , C: MT-System intakt, D: massive F-Aktin-Fragmentierung mit ausgeprägten Zellretraktionen; E-F-G: 2 μg , E: Optisch intaktes MT-System, F: fragmentiertes F-Aktin; G: Doppelimmunfluoreszenz zeigt ausgeprägte Zellretraktionen mit interzellulärer MT-Brückenbildung. Pfeile markieren MT-MF-Kolokalisationen. - (*): identischer Bildausschnitt. Repräsentative Bildausschnitte aus 3 separaten Experimenten.

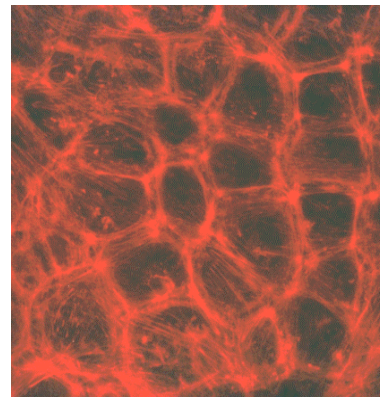
3.4.1.2 F-Aktin-Fragmentierung und intakte MT-Systeme pulmonaler Endothelzellen nach Applikation von *Clostridium difficile*-Toxin B-10463

TcdB-10463 führte vergleichbar mit Cytochalasin D zu einem F-Aktin-Verlust in pulmonalen Endothelzellen. Die Endothelzellen wurden über 240 Minuten mit Toxin B in Konzentrationen von 10 ng, 100 ng und 200 ng stimuliert. Das Toxin zeigte keine eindeutigen morphologischen Veränderungen am Mikrotubulus-System. Die Filamente waren nach Applikation aller drei Konzentrationen mikroskopisch erkennbar und reichten in typischer Anordnung sternförmig vom paranukleär lokalisierten Zentrosom in die Peripherie zur Zellmembran. In Abb. 17-C sind nach Applikation von 100 ng Toxin B Mikrotubulus-Systeme erkennbar. Neben filamentären Mikrotubuli und den Zentrosomen (vgl. Pfeile) wurden auch Zellteilungen mit Mikrotubulus-Spindel gesehen, was auf ein eher intaktes Mikrotubulus-System hindeutet. Nach Stimulation mit 100 ng und 200 ng Toxin B kam es zu vermehrten Zellretraktionen innerhalb des Monolayers (nicht gezeigt). Die retrahierten Zellen wirkten grün überstrahlt. Die geschrumpften Zellen zeigten lange mikrotubuläre Zellbrücken. TcdB-10463 führte zu einem Verlust filamentären Aktins. Nach Applikation von 10 ng/ml Toxin B kam es im Bereich der Mikrofilamente bereits zu leichten Veränderungen (nicht gezeigt). Die wabenartige Struktur der peripheren Aktinfilamente war bei dieser Toxinkonzentration noch zu erkennen, jedoch zeigten sich vermehrt F-Aktin-Verdichtungen, Stressfasern und Fragmentierungen von Mikrofilamenten. Insgesamt schien der Monolayer im Vergleich zu unstimulierten Zellen sehr unruhig. Nachbarzellen rückten leicht auseinander, wodurch sich kleine Zellzwischenräume bildeten. Nach Applikation von 100 ng und 200 ng Toxin B-10463 (Abb. 17-D) zeigten sich deutliche Veränderungen der Monolayer. An vielen Stellen bildeten sich retrahierte Zellen, deren mikrofilamentäres Zytoplasma in komprimierter Form zu roten Überstrahlung in den Abbildungen

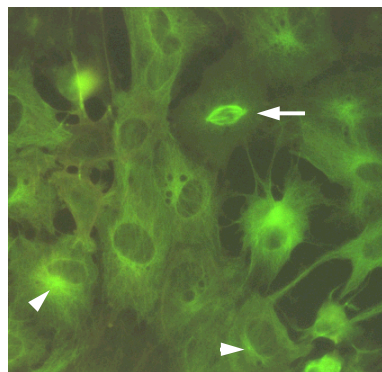
führten. Lange Plasmabrücken mit fragmentiertem F-Aktin bildeten die Verbindungen zwischen den retrahierten Endothelzellen und ihren Nachbarzellen (vgl. Pfeile in Abb. 17-D). Nichtretrahierte Zellen zeigten in ihrem Zytoplasma fragmentiertes filamentäres Aktin. Durch die zahlreichen Zellschrumpfung kam es zu einer ausgeprägten Lückenbildung innerhalb der Endothelzell-Monolayer.



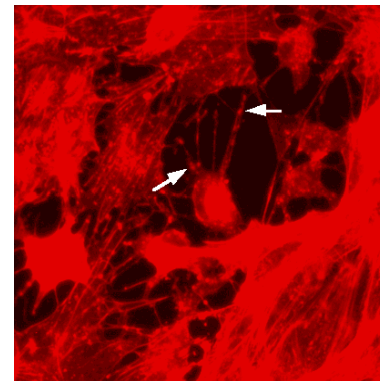
17-A



17-B



17-C



17-D

Abb. 17: Mikrotubulus- und Aktin-Filamente nach Stimulation mit *Clostridium difficile*-Toxin B-10463. A-B: unbehandelte Kontrollzellen; C-D: 100 ng/ml, C: Intaktes MT-System mit MT-Mitose-Spindel (Pfeil), Pfeilköpfe markieren Zentrosomen; D: Abrundungen von Endothelzellen bei ausgeprägter F-Aktin-Fragmentierung, Pfeile markieren fragmentiertes F-Aktin in Interzellulärbrücken; Grüne Färbung: Mikrotubulus-Systeme; Rote Färbung: F-Aktin. Typische Bildausschnitte aus 3 separaten Experimenten.

3.5 Barrierefunktionsstörungen pulmonaler Endothelzellen durch bakterielle Toxine

3.5.1 *Staphylococcus aureus*- α -Toxin erhöht die Permeabilität pulmonaler Endothelzellen

Die Bolusgabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ *Staphylococcus aureus* α -Toxin führte zu einem schnellen und deutlichen Anstieg der Filtrationsrate. Höchstwerte lagen bei $8,0 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ Wasserflussrate. Eine Reversibilität durch Rückbildung der filtrierten Flüssigkeitsmengen nach Bolusgabe im Versuchszeitraum war nicht erkennbar.

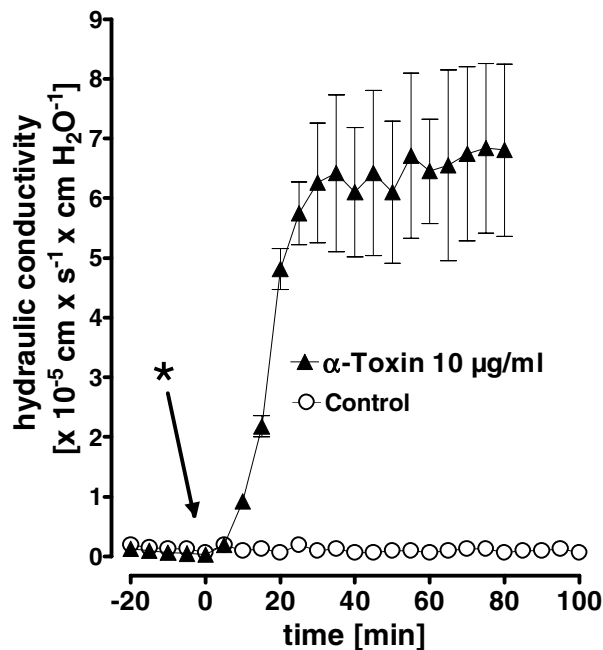
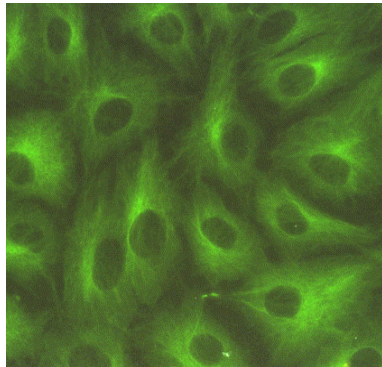


Abb. 18: Permeabilitätszunahme pulmonaler Endothelzellen nach Bolus-Gabe von *Staphylococcus aureus*- α -Toxin. (*) kennzeichnet Boluszugabe zum Zeitpunkt $t=0$ Minuten. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde auf die gesealten Monolayer 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin als Bolus gegeben. *Staphylococcus aureus* α -Toxin zeigte einen raschen Anstieg der Wasserflussrate mit Plateauphase. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 separaten Experimenten.

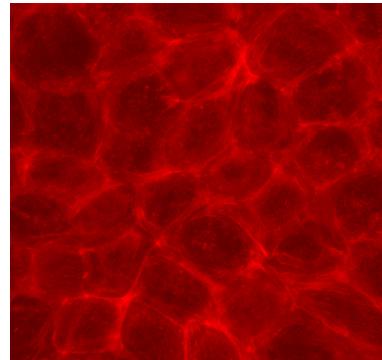
3.5.2 Destruktion von MT-Filamenten und F-Aktin nach Applikation von *Staphylococcus aureus*- α -Toxin

Pulmonale Endothelzellen wurden zur Untersuchung des Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystems über 60 Minuten mit *Staphylococcus aureus*- α -Toxin in Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Nach Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ des α -Toxins (Abb. 19-C) zeigten sich im Vergleich zu ruhenden Zellen (Abb. 19-A) diskrete Veränderungen endothelialer Mikrotubulusstrukturen. MT-Filamente waren vom Zentrosom auswachsend bis zur Zellmembran erkennbar. Das Zytoplasma war entsprechend einer verstärkten MT-Depolymerisation oder Neusynthese von Tubulineinzelmolekülen grün angefärbt. Die paranukleär gelegenen Zentrosomen traten optisch in den Vordergrund (vgl. Pfeile Abb. 19-C), was auf Aktivität der Mikrotubulus-Neusynthese hinwies. Das F-Aktin-System der Endothelien zeigte nach 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin (Abb. 19-D) zytoplasmatische Verdichtung der wabenartigen F-Aktin-Strukturen. Darüber hinaus waren Stressfasern, Zellretraktionen und Öffnungen kleiner interzellulärer Spalten zu beobachten. In einigen Zellen waren feine mikrofilamentäre granuläre Strukturen erkennbar (vgl. Pfeilkopf). 40 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin (Abb. 19-E) führten zu anormalen Mikrotubulus-Strukturen. Die Fasern lagen zirkumferent im gesamten Zytoplasma und ihre „korbartige“ Morphologie erinnerte eher an die Gestalt von Intermediär-Filamenten (s. Abb. 1-C). In vielen Zellen liessen sich keine MT-Strukturen anfärben. Zentrosomen, die ein Hinweis auf aktive MT-Synthese darstellen, waren in keiner der Zellen erkennbar. Nach Applikation von 40 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin (Abb. 19-F) fanden sich F-Aktin-reiche Zellen mit Stressfaserbildung neben solchen Endothelzellen, in deren Zytoplasma kaum F-Aktin in Form von Bündeln und Geflechten vorhanden war. Stressfasern konnten nur in solchen Zellen beobachtet werden, in denen auch Mikrotubulusstrukturen vorhanden waren. In anderen Zellen zeigte sich ein feines granuliertes F-Aktin (vgl. Stern). Einzelne Zellen lösten

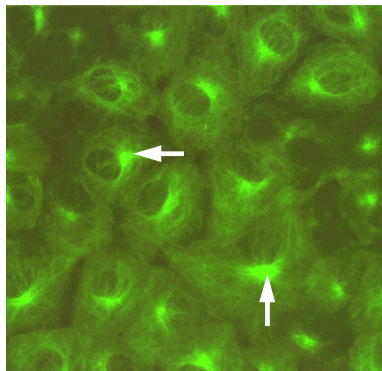
sich aus dem Zellverband und hinterliessen große Zelllücken im Endothelzellmonolayer (vgl. Pfeil).



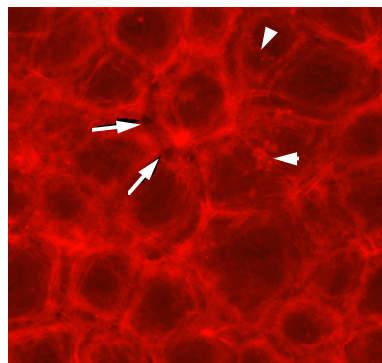
19-A



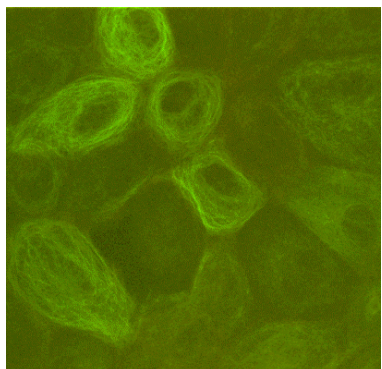
19-B



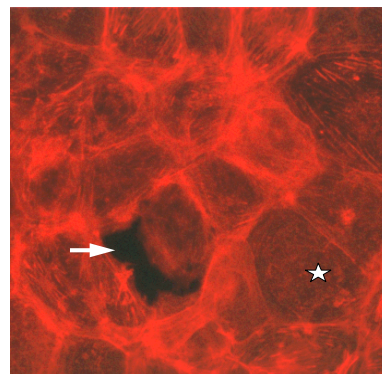
19-C (*)



19-D (*)



19-E (*)



19-F (*)

Abb. 19: Mikrotubulus- und Aktin-Filamente nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus*- α -Toxin für 60 Minuten. A-B: Kontrollzellen; C-D: 10 μ g/ml, C: Pfeile markieren optisch betonte Zentrosomen, D: Pfeile markieren Gaps, Pfeilköpfe markieren F-Aktin-Fragmentierung; E-F: 40 μ g/ml, E: anormale und destruierte MT-Strukturen, F: Zytolyse, Destruktion von F-Aktin, Pfeil markiert Zellkollaps, Stern markiert geschädigte Endothelzelle mit feingranuliertem F-Aktin; (*): identischer Bildausschnitt. Typische Bildausschnitte aus 3 separaten Experimenten.

3.6 Auswirkungen von Kombinationen Mikrotubulus-stabilisierender und MT-destabilisierender Substanzen auf das Zytoskelett pulmonaler Endothelzellen

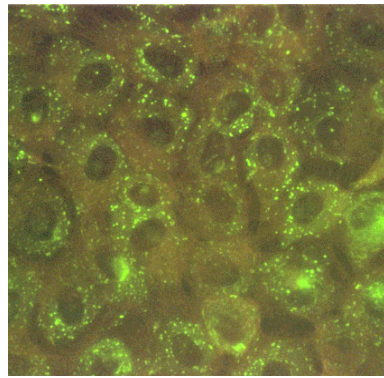
Zur Klärung der Frage, wie endotheliale Mikrotubulus-Systeme auf eine Kombination von MT-depolymerisierenden und MT-stabilisierenden Agenzien reagieren, wurde diese Versuchsreihe durchgeführt. Es sollten ausserdem die Veränderungen der F-Aktin-Systeme und Veränderungen der Endothelzellmonolayer im Hinblick auf den jeweiligen MT-Status (MT-Stabilität vs. MT-Abbau) beobachtet werden.

Da Vinca-Alkakoide neben bekannter MT-Depolymerisation auch optisch gut darstellbare Tubulin-Aggregatbildung induzieren, wurde diese Substanzgruppe gegenüber Colchicin bevorzugt. Pulmonale Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 180 Minuten mit Paclitaxel in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 10 μM inkubiert. Nach 60 Minuten Inkubationszeit wurden 100 μM Vincristin auf die stimulierten Endothelzellen dazugegeben.

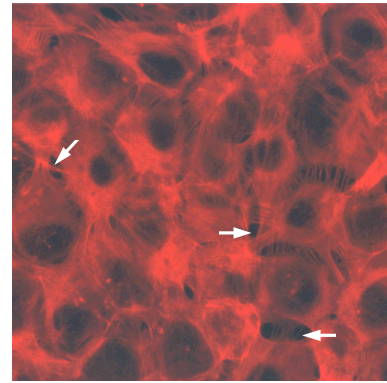
3.6.1 Retraktionen, Stressfaser- und Lücken-Bildung pulmonaler Endothelzellen korrelieren mit MT-Stabilisation bzw. Destabilisation

Nach Vorinkubation der Endothelzellen mit 0,1 μM Paclitaxel und anschließend erneuter Stimulation mit 100 μM Vincristin (Abb. 20-A) zeigte das endotheliale Mikrotubulus-System wenig stabilisierte Mikrotubuli bei deutlich ausgeprägter parakristalliner Aggregatbildung (Paclitaxel-Wirkung vgl. Kap. 3.2.4.2; Vincristin-Wirkung vgl. Kap. 3.2.3.2). Die Zytoplasmen der Zellen waren grün angefärbt, was auf eine erhöhte Plasmakonzentration an Tubulineinzelmolekülen hindeutete. Das Mikrofilament-System zeigte in dieser

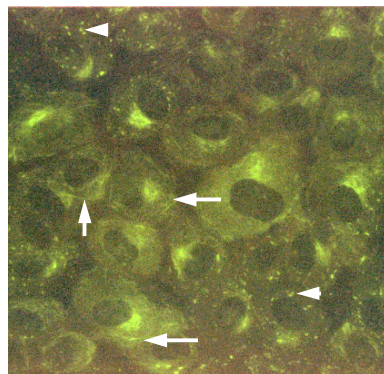
Konzentrationskombination (Abb. 20-B) deutlich zytoplasmatische F-Aktin-Verdichtungen, Stressfaserbildung, allgemeine Zellretraktionen mit Lückenbildung (vgl. Pfeile Abb. 20-B). Im Vergleich mit 100 μ M Vincristin ohne Paclitaxelzusatz zeigten sich hierbei aber deutlich schwächere Effekte. Mit zunehmender Paclitaxelkonzentration (vgl. Abb. 20-C) bei gleichbleibender Vincristindosierung (Paclitaxel 1 μ M und Vincristin 100 μ M) nahmen die stabilisierten Mikrotubuli quantitativ zu (vgl. Pfeile) bei gleichzeitiger Abnahme von parakristallinen Aggregaten (vgl. Pfeilköpfe). Dies führte zu einem Überwiegen von stabilisierten MT mit deutlich weniger ausgeprägter Zellretraktion, Stressfaser- und Lückenbildung (Abb. 20-D). Die beschriebene Tendenz setzte sich bei der nächst höheren Paclitaxel-Konzentration fort (Paclitaxel 10 μ M und Vincristin 100 μ M, nicht gezeigt). Die Endothelzellen zeigten bei eindeutigem Überwiegen von stabilisierten MT einen konfluenten Monolayer mit nur gering ausgeprägter Stressfaserbeteiligung, Lückenbildung und Zellretraktionen.



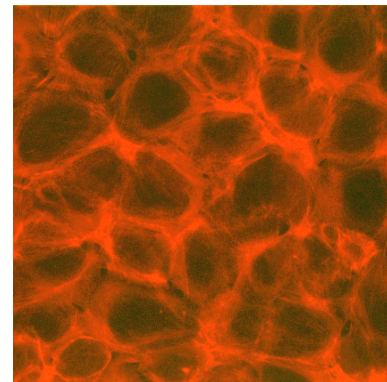
20-A



20-B



20-C (*)



20-D (*)

Abb. 20: Mikrotubulus- und Aktin-Filamente nach Stimulation pulmonaler Endothelzellen mit 100 μ M Vincristin bei Paclitaxel-Vorinkubation. A-B: Paclitaxel 0,1 μ M, A: Überwiegen von Vincristin-induzierter MT-Depolymerisation und MT-Aggregatbildung; B: F-Aktin-Umverteilung und Gap-Bildung (Pfeile); C-D: Paclitaxel 1 μ M, C: Überwiegen stabiler MT-Systeme, D: Moderate F-Aktin-Umverteilung und reduzierte Gap-Bildung im Vergleich zu 10-B; (*) : identischer Bildausschnitt.

4. Diskussion

Die Intaktheit des Mikrofilament-Systems ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Endothelzellen (21, 51, 74, 116, 137, 139). Die Funktion des Mikrotubulus-Systems ist in diesem Zusammenhang noch weitgehend unklar. In der vorgelegten Arbeit untersuchten wir primär das Verhältnis der beiden dynamischen Proteine (MT, MF) und ihre Bedeutung innerhalb der endothelialen Barriere. Es wurden MT-depolymerisierende und MT-stabilisierende Substanzen zur Untersuchung der Barrierefunktion und der zytoskelettären Filamente eingesetzt. Ferner fanden Substanzen Verwendung, bei denen Barrierestörungen endothelialer Zellen vorbeschrieben waren. Dabei wurden die Wirkungen und Wechselwirkungen bei Mikrotubulus- und Mikrofilamenten beobachtet.

4.1 Mikrotubulus-Systeme regulieren F-Aktin und die endotheliale Barrierefunktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Mikrotubulus-Systeme in enger funktioneller Verbindung mit F-Aktin stehen und zur Endothel-Permeabilität wesentlich beitragen. Die Mikrotubulus-Depolymerisation pulmonaler Endothelzellen durch Colchicin und Vinca-Alkaloide führte zu einer signifikanten Barrierefunktionsstörung. Der MT-Abbau führte zeit- und dosisabhängig zu einer 5-10fachen Zunahme der hydraulischen Konduktivität. Dagegen zeigte die MT-stabilisierende Substanz Paclitaxel keine signifikant-messbare Permeabilitäts-Zunahme. Die in dieser Arbeit gezeigten morphologischen Befunde des Zytoskeletts nach MT-Abbau erklären die festgestellten Permeabilitäts-Veränderungen: Die Depolymerisation von Mikrotubulus-Systemen verändert morphologisch F-Aktin. Mit ansteigenden Spindelgift-Konzentrationen verteilen sich Aktin-Filamente über das gesamte Zytoplasma. Es werden Stressfasern ausgebildet und Zell-Retraktionen mit interzellulärer Lückenbildung werden erkennbar. Ein Anstieg der parazellulären Permeabilität wird somit verständlich. Die Umstrukturierung von F-Aktin nach MT-

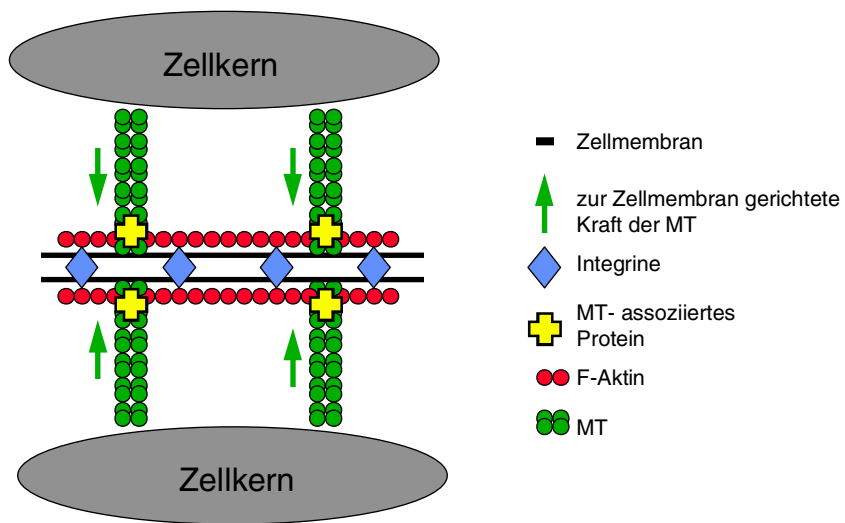
Depolymerisation konnte in dieser Arbeit quantifiziert werden. Sowohl Colchicin als auch Vinblastin bewirkten intrazellulär teils deutlich erhöhte F-Aktin-Werte. Die genauen Zusammenhänge zur Klärung der F-Aktin-Umverteilung, Stressfaserbildung und Barriestörung nach MT-Depolymerisation sind noch unklar. Sowohl biochemische als auch mechanische Aspekte bieten Erklärungsansätze der beschriebenen Ereignisse:

Es ist bekannt, dass junktionale Aktinfilamente sich kontinuierlich in der Peripherie der Endothelzellen ausdehnen („peripheral dense band“) und wesentlich an der Barrierefunktion des Endothels beteiligt sind (2, 21, 24, 51). Die Adhäsionsverbindungen zwischen Endothelzellen und der extrazellulären Matrix werden durch einen komplexen Verbund von intrazellulärem F-Aktin und Bindeproteinen aufgebaut und durch komplexe Signalkaskaden reguliert (1, 21, 74). Studien zeigten, dass die kleinen GTP bindenden Rho-Proteine in Verbindungen mit aktinfilamentären „Adhäsions-Plaques“ stehen und an der Ausbildung von Stressfasern und Kontraktilitätsveränderungen von Zellen beteiligt sind (51). Offenbar bestehen aber auch Verbindungen zwischen Rho-Proteinen und Mikrotubulus-Systemen. So wurden in neueren Studien MT-Interaktionen zur Rho-Signalkaskade beschrieben mit Zunahmen von Kontraktilität und Stressfaserbildung nach MT-Depolymerisation (51, 70, 159). Neueste Studien beschreiben das MT-gebundene Protein GEF-H1, welches die MT-induzierte Interaktion mit Rho-Proteinen und F-Aktin reguliert (65). GEF-H1 wird demnach bei MT-Depolymerisation freigesetzt und aktiviert, wodurch die Rho-Kaskade mit aktinfilamentären Kontraktilitätszunahmen und Stressfaserbildung in Gang gesetzt wird.

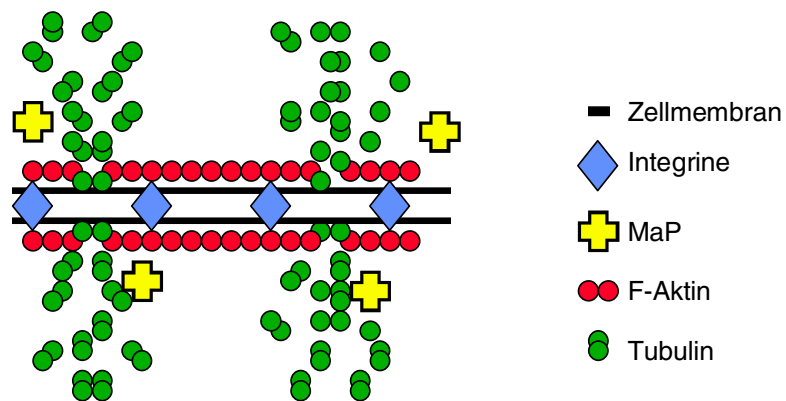
Die endotheliale Barriere setzt in ihrer Funktion ein intaktes Zytoskelett voraus, das aus einem komplexen, in sich verwobenen Netzwerk dreier Filamentgruppen (MT, MF, IF) besteht. Diese stehen über assoziierte Proteine miteinander in Wechselwirkung (7, 18, 44, 56, 103, 113, 151). Mit Hilfe von dynamischen MaPs können Organellen entlang der MT in anterograde oder retrograde Zielrichtungen

bewegt werden. MaPs können dabei auch Aktin- und Intermediärfilamente binden, bewegen und beispielsweise Kreuzbrücken aufbauen (7, 18, 19, 44, 103, 113). Ingber berichtet in seinem mechanischen Ansatz zur Erläuterung der Zytoskelettfunktion von „Zugseilen und Haltestricken“, die die zelluläre Formstabilität im Gleichgewicht halten. Die röhrenförmigen Mikrotubulus-Filamente wirken in diesem Zusammenhang als steife Streben, die Kontraktionen des mikrofilamentären Zellkortex und Druckkräften von außen entgegenwirken können (56). Die in dieser Arbeit beschriebenen Sekundärreaktionen nach MT-Depolymerisation (F-Aktinverteilung, Stressfaserbildung, Zellretraktionen, Zelllückenbildung) sollten somit auch mechanisch erklärbar sein: Über die stabilen MT-Leitschienen werden F-Aktinfilamente via Filament-assoziiierter Proteine (z.B. MaP Kinesin) nach außen zur Zellmembran bewegt, wo diese als periphere Aktinbänder Adhäsionskomplexe über Bindeproteine bilden und zur Barrierefunktion beitragen. Nach MT-Depolymerisation fällt der nach außen gerichtete mikrotubuläre Druck ab und MT-MaP-MF-Bindungen lösen sich (Schema 5-B). Es überwiegen nach innen gerichtete Zugkräfte (z.B. durch Zellkortex und Intermediärfilamente), die F-Aktin aus der Peripherie ins Zytoplasma führen. Die Adhäsionsbindungen lösen sich partiell, es entstehen interzelluläre Lücken, die zur Barrierestörung führen. In diesem Zusammenhang ist auch eine gesteigerte F-Aktinsynthese denkbar (Schema 5-C), da F-Aktin über Bindungsverluste von Capping-Proteinen (MaP) am „barbed-end“ frei wird und eine MF-Neupolymerisation einsetzen kann. F-Aktin bleibt in interzellulären Brücken bestehen und Kontakte zwischen Nachbarzellen erhalten. Hierbei bestehen möglicherweise entweder besonders stabile mikrofilamentäre Adhäsionskontakte oder das durch Zell-Retraktion reduzierte Kräfteverhältnis reicht nun nicht mehr aus, um weitere Adhäsionen zu lösen (Schema 5-D).

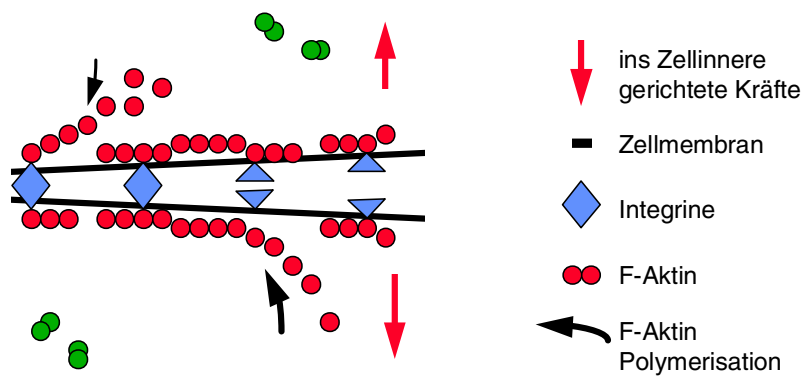
(A)



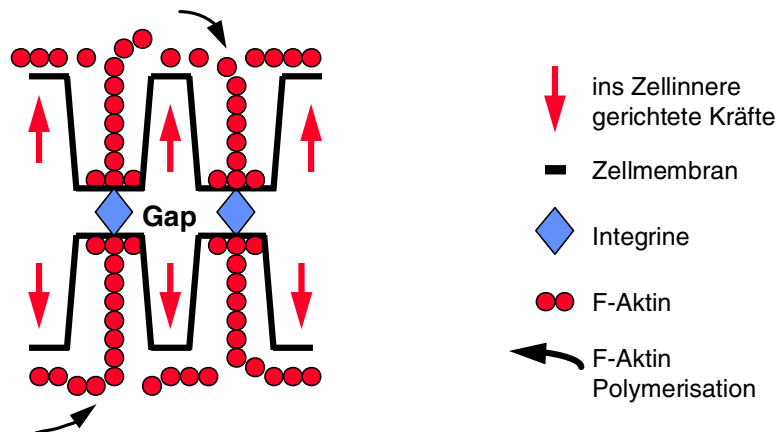
(B)



(C)



(D)



Schema 5: Modellvorstellung zur MT-MF-Interaktion über MaP zur Aufrechterhaltung junctionaler Adhäsionsverbindungen zwischen Zellen und mögliche Ereignisse nach MT-Depolymerisation. 5-A: Mikrotubuli stabilisieren junctionale Adhäsionsverbindungen. Über MT-Leitschienen durch MaP verknüpft (z.B. Kinesin) erfolgt der F-Aktin-Transport in den Zellmembranbereich. Der nach außen gerichtete mikrotubuläre Druck stabilisiert die Verbindungen von F-Aktin und Integrinen mit Nachbarzellen. 5-B: MT-Depolymerisation führt zu einem Verlust der nach außen gerichteten Druckkräfte und der MT-MaP-MF-Verbindungen. 5-C: Das Überwiegen intrazellulärer Zugkräfte führt zur Destabilisation junctionaler Adhäsionen. Es bilden sich interzelluläre Lücken. 5-D: F-Aktin-Zellbrücken stabiler Adhäsionsverbindungen überbrücken interzelluläre Lücken.

Der beschriebene mechanische Ansatz morphologischer Veränderungen nach MT-Abbau kann zusätzlich durch die oben beschriebene Aktivierung biochemischer Signalwege verstärkt bzw. ergänzt werden. Durch Freisetzung von GEF-H1 nach MT-Depolymerisation können Rho-Proteine aktiviert werden, die ihrerseits zu Stressfaserbildung führen und über MLC-Phosphorylierung zu einer Zellkontraktilitäts-Zunahme beitragen (65). Dies würde eine entstehende Barrierefunktionsstörung verstärken. Die beschriebenen Resultate stehen in Einklang mit den Studien von Verin et al, die nach MT-depolymerisierenden Substanzen eine EC-Barrierestörung und nach Vorinkubation durch Paclitaxel einen signifikant

schwächeren Effekt beobachteten (151). Die Untersuchungen mit der MT-stabilisierenden Substanz Paclitaxel zeigte in der vorgelegten Arbeit im Vergleich zur MT-Depolymerisation ebenso deutlich abgeschwächte Effekte. Paclitaxel fördert die Bildung anormaler, ungewöhnlich stabiler Mikrotubuli (8, 26, 90). Nach Applikation der Substanz waren keine signifikanten Permeabilitätszunahmen festzustellen. Morphologisch zeigten sich betonte MT-Strukturen, die zu keiner wesentlichen Veränderung des F-Aktins führten. Auch zeigten sich keine interendothelialen Lücken. Offenbar werden durch die stabilisierten MT-Systeme Voraussetzungen erfüllt, die für eine funktionierende Barrierefunktion erforderlich sind. Nach dem oben beschriebenen Modell (Schema 5) und dem Erklärungsansatz von Ingber (56) bleiben die durch Paclitaxel künstlich stabilisierten MT-Streben einschließlich der MT-MaP-MF-Verbindungen erhalten, und tragen zur Zellkonfluenz bei.

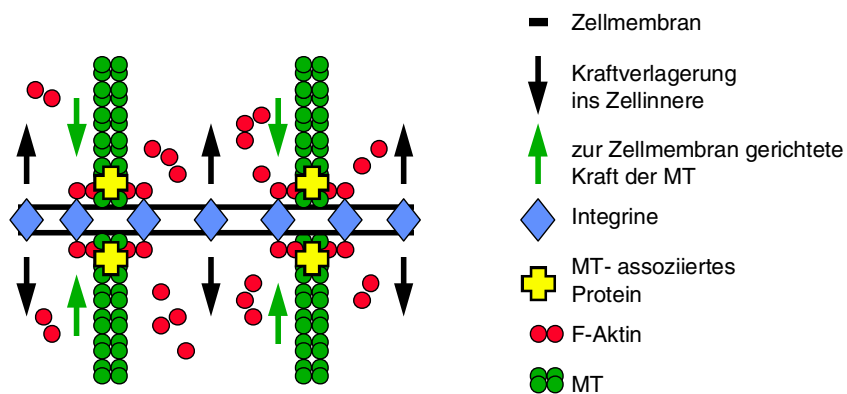
Die Kombinationsexperimente der vorgelegten Arbeit mit depolymerisierenden (Vincristin) und stabilisierenden MT-Toxinen (Paclitaxel) unterstreichen die enge Wechselbeziehung der beiden dynamischen Filamentsysteme MT und Aktin. Ein Überwiegen von depolymerisierten MT gegenüber stabilen MT führte direkt zu einer F-Aktin-Umverteilung, konsekutiv mit Zellretraktionen und Zelllückenbildung. Umgekehrt zeigte sich bei höherdosierten Paclitaxel-Konzentrationen ein Übergewicht an stabilen MT gegenüber depolymerisierten MT mit einer deutlich geringer ausgeprägten Retraktions- und Zelllücken-Bildung.

4.2 Stabilisation von Adhäsionsverbindungen pulmonaler Endothelzellen durch MT-Systeme nach F-Aktinverlust durch Cytochalasin D und TcdB-10463

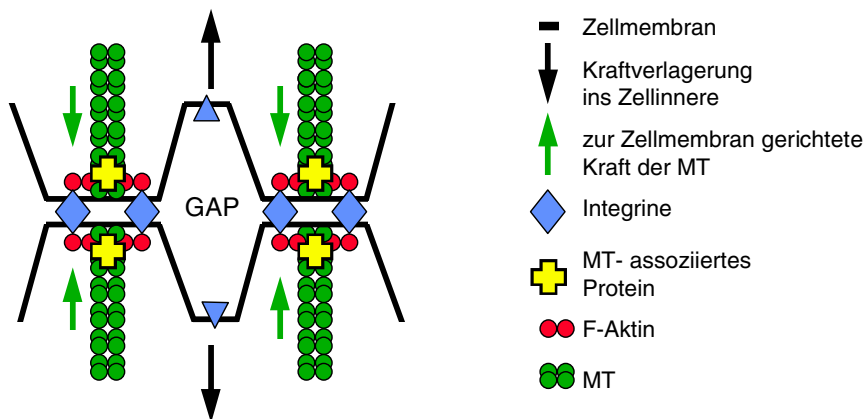
Cytochalasin D wirkt mit hoher Affinität am schnell wachsenden Plus-Ende von F-Aktin („barbed end“) und hemmt dadurch die weitere Polymerisation der Mikrofilamente. Am entgegengesetzten „pointed end“ erfolgt die Abdissoziation von G-Monomeren und es entsteht eine Verkürzung des Polymers (12, 13, 15, 114).

Cytochalasin D reduziert signifikant den endothelialen F-Aktin-Gehalt (123) und „zerteilt“ Aktinfilamente in kürzere Abschnitte (15). Permeabilitätsmessungen ergaben nach Cytochalasin D-Bolus-Gabe einen raschen und reversiblen Anstieg der hydraulischen Konduktivität. Morphologisch zeigte sich die Wirkung des Pilzmetabolites in einer massiven intrazellulären F-Aktin-Fragmentierung. Die Zell/Zellkontakte waren großflächig aufgelöst und die EC-Monolayer zeigten ausgeprägte Zell-Retraktionen mit großen interzellulären Lücken und interzellulären MT-Brücken. Verantwortlich für die deutlichen Permeabilitätszunahmen und die morphologischen Veränderungen der EC-Monolayer ist primär der Abbau des F-Aktins. Die Mikrofilamente sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere und der Zellform beteiligt (21, 24, 74, 116). Die Untersuchung der Mikrotubulus-Strukturen nach Cytochalasin D-Gabe zeigte in stark retrahierten Zellen filamentäre MT, Zentrosomen und Mitose-Spindeln als Zeichen intakter MT-Systeme. Darüber hinaus zeigten die Zellen trotz fulminanter Retraktion und großer Zelllücken eine deutlich ausgebildete Zellbrückenbildung. In diesen Zellbrücken waren Mikrotubulus-Filamente erkennbar, die über größere Distanzen, mit den Nachbarzellen verbunden, Zell/Zellkontakte bildeten. Interessanterweise bestanden die „Brückenköpfe“, mit denen die Mikrotubuli verknüpft waren, aus F-Aktin. Die morphologischen Ergebnisse nach CD-Stimulation geben somit Anlass zu der Annahme, dass MT-Systeme in Verbindung mit F-Aktin junctionale Adhäsionsverbindungen bilden können (vgl. Schema 6). Diese Annahme steht in Einklang mit Studien, die Verknüpfungen zwischen MT und fokalen Adhäsionen sowie eine beschleunigte fokale Kontaktentwicklung durch MT beschreiben (6, 23, 70, 97, 105). Darüber hinaus scheinen intakte MT-Systeme für die Wiederherstellung retrahierter Zellen von großer Bedeutung zu sein. Die Reversibilität der Barrierestörung, die bei Permeabilitätsmessungen nach CD-Applikation festzustellen ist (15, 51, 124), könnte über das intakte MT-System erklärt werden. Nach Beendigung der „barbed end“-Blockade und nach Beginn erneuter F-Aktin-Polymerisation könnten MF, die mit MT-Strukturen verknüpft sind, ein rasches

(A)



(B)



Schema 6: Modellvorstellung zur MT-MF Interaktion nach F-Aktin-Zerstörung durch Cytochalasin D und TcdB-10463. 6-A: Die massive Fragmentierung der MF führt zur Auflösung junctionaler F-Aktin-Integrinbindungen. 6-B: MT führen im Verbund mit F-Aktinfragmenten zu einer Stabilisierung lokaler Adhäsionsbindungen. In den Bereichen der Adhäsions-Verluste kommt es durch einwärtsgerichtete Zugkräfte zu großen Zelllücken (Gaps) und es entstehen interzelluläre MT-Brücken.

„Wiederaufspannen“ der retrahierten Zellen bewirken und folglich zur Wiederherstellung der Barrierefunktion der EC führen. Diese Erklärungsansätze stehen in Einklang mit Ingber, der in seinen Ausführungen zum Aufbau und zur Funktion eines intakten Zytoskeletts F-Aktin mit „zellulären Zugseilen“ und das MT-System mit „druckresistenten stabilen Streben“ verglich und für Lösungen vieler

Fragen bezüglich MT, MF und der Zellformbildung auf ihre lokalen Verknüpfungen innerhalb der „3-dimensionalen Architektur“ hinwies (56).

Das Toxin B von *Clostridium difficile* ist ein einkettiges 270-kDa Molekül, welches über Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Innerhalb der Zellen glukosyliert das Toxin Rho-Proteine am Threonin in Position 35/37, die dadurch inaktiviert werden (51, 60, 61). Die Hemmung der Rho-Proteine führt zu einem Verlust von F-Aktin und der endothelialen Barrierefunktion (51). Messungen des endothelialen F-Aktins nach Stimulation mit 100 ng/ml TcdB zeigten einen Verlust des F-Aktins von bis zu 50% (51). Die in der vorgelegten Arbeit dokumentierten morphologischen Untersuchungen von MT und MF nach TcdB-10463-Stimulation zeigen, dass insbesondere das Mikrofilamentsystem von der Toxin-Wirkung betroffen wird. Grobe und feingranulierte F-Aktin-Fragmentierungen waren so stark ausgeprägt, dass Zellen ihre fokalen Kontakte verloren und retrahierten. Dabei entstanden große Interzellularlücken im Bereich der Endothelzellmonolayer, die die gemessene Hyperpermeabilität erklären. Das MT-System zeigte dagegen keinen Hinweis auf TcdB-10463-induzierte Schäden. Nach 240 Minuten Einwirkungszeit waren neben feingliedrigen MT-Filamenten und Zentrosomen auch Mitosevorgänge mit der Ausbildung mikrotubulärer Spindeln zu beobachten. Das Mikrotubulus-System wurde durch die ausgeprägten Zellformveränderungen aber passiv in seiner Form verändert. In retrahierten Endothelzellen zeigten sich filamentäre MT in langen Zellbrücken zwischen den Nachbarzellen. Die Ergebnisse ähneln den Resultaten nach Cytochalasin D-Inkubation. Das intakte MT-System trägt über die Brücken zu Verbindungen mit Nachbarzellen bei (vgl. Schema 6-B). Das setzt eine Verknüpfung zwischen dem MT-System und fokalen Adhäsionsbindungen voraus.

4.3 Granulozytäre Wirkstoffe führen zu einer endothelialen Barrierestörung durch Stressfaser- und Zelllücken-Bildung

Humane neutrophile Elastase (HNE) gilt in bezug auf ihre breite Substratspezifität und ihre Proteolysekinetik als hochpotente granulozytäre Protease (134). Studien sprechen HNE eine wichtige PMN-mediierte Rolle zur Veränderung endothelialer Zell-Funktionen zu. Smedly et al. beschrieben HNE als den wesentlichen Faktor der Neutrophilen-initiierten Endothelverletzungen (127). Darüber hinaus wurden HNE-abhängige Zunahmen transendothelialer Albuminpassagen beschrieben (93). Permeabilitätsmessungen an pulmonalen Endothelzellen ergaben eine 10-20fache Zunahme der Wasserflussrate nach HNE-Stimulation (138). Die Ursache der endothelialen Schrankenstörung ist jedoch weitgehend unklar. Es werden unterschiedliche Wirkmodi diskutiert. HNE könnte enzymatisch zu einer Endothelzellschädigung mit Schrankenstörung führen oder nicht-enzymatisch als Kation-Protein wirken (93, 138). Die morphologischen Untersuchungen auf HNE-induzierte Veränderung des Mikrotubulus-Systems erbrachten keine eindeutigen Hinweise. Die MT-Systeme zeigten in allen Protease-Konzentrationen feingliedrige Filamente und Zentrosomen. Vielmehr schien das F-Aktinsystem in HNE-assoziierte zytoskelettäre Änderungen involviert zu sein. Mit zunehmendem Volumen der PMN-Überstände zeigten sich massiv ausgeprägte Stressfasern, F-Aktinverdichtungen, lokale Zellretraktionen mit interzellulären Gaps sowie diskrete F-Aktin-Fragmentierungen. Ein deutlicher Mikrofilamentabbau, der durch ausgeprägtere F-Aktin-Fragmentierungen sichtbar würde (vgl. Cytochalasin D und TcdB-10463, Kap. 4.2), war hierbei aber nicht zu beobachten. Die Endothelzellen zeigten deutlich ausgeprägte Formveränderungen. Darüber hinaus waren Zelllücken erkennbar, die die Zunahme der Wasserflussrate erklären können. Die beschriebenen Barrierestörungen beruhen wahrscheinlich auf einer Aktivierung kontraktiler zytoskelettärer Komponenten, wie dem Aktomyosin, das über komplexe Stoffwechselwege gesteuert wird. Durch entstehende Zellkontraktionen und die Ausbildung von Stressfasern könnten Adhäsionsbindungen gelöst werden. Suttorp et al. (138) diskutierten in

diesem Zusammenhang direkte Schädigungen der interendothelialen Verbindungen und der subendothelialen Matrix, die zur Ausbildung von Zelllücken und Barrierestörungen führen.

Von PMN sezernierte Sauerstoffradikale können zu einer akuten Zellschädigung führen (4, 132). Die Exposition von pulmonalen Endothelzellen mit H_2O_2 kann schwerwiegende metabolische und funktionelle Störungen zur Folge haben. Die Aktivierung der Arachidonsäurekaskade, DNA-Strangbrüche, ATP-, cAMP- und NAD-Reduktionen sowie die Hemmung der Glykolyse und Proteolysereaktionen wurden in diesem Zusammenhang beschrieben (110, 132, 154, 155, 156). Als Auswirkung der Zellschädigung gegenüber pulmonalen Endothelzellen mit Destruktion des Zytoskeletts wurde eine Permeabilitätszunahme gegenüber Wasser und Albumin festgestellt (4, 50, 143, 154). H_2O_2 führte zeit- und dosisabhängig zu einem Anstieg der hydraulischen Konduktivität endothelialer Monolayer (143, 154). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten morphologischen Veränderungen des endothelialen Zytoskeletts ergaben nach niedriger H_2O_2 -Exposition (10 μM) sowohl bei den Mikrotubulus- als auch bei den Mikrofilamenten Veränderungen: MT zeigten, bei weitgehendem Erhalt ihrer Filamente, Hinweise für Neusynthese oder Depolymerisation. Das F-Aktin blieb in seiner filamentären Struktur, zeigte aber eine ausgeprägte Umverteilung und Verdichtung mit massiver Stressfaserbildung. Innerhalb der EC-Monolayer waren Zellretraktionen und die Bildung kleiner Interzellularlücken auffällig. Die beschriebenen morphologischen F-Aktin-Veränderungen nach niedriger H_2O_2 -Dosierung stimmen mit den Beschreibungen von Barnard et al. überein (4). Hier wurde die H_2O_2 -Applikation mit vermehrten peripheren Aktinfilamenten und Zelllückenbildungen assoziiert. Ursächlich wurden intrazelluläre Signalwege, wie die Aktivierung der Proteinkinase C beschrieben, die zu einer mikrofilamentären Reorganisation mit Zelllücken und Barrierestörung führte. Aber auch eine MLCK-abhängige Zellkontraktions-Zunahme mit Zelllückenbildung wird im Zusammenhang mit H_2O_2 -induzierter Endothelpermeabilitätsstörungen gesehen (110, 137, 143). Umverteilung und die Verdichtung von F-Aktin nach H_2O_2 -

Applikation wurden auch in der Arbeit von Roth bestätigt (110). Dabei wurde der Übergang einer frühen F-Aktin-Depolymerisationsphase in eine spätere Polymerisationsphase mit signifikant erhöhtem F-Aktingehalt beschrieben (110). Ausgeprägte morphologische Veränderungen der EC-Monolayer wurden bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen (100 μM , 1 mM) festgestellt. Hier waren mikrotubulär und mikrofilamentär deutliche Destruktionen der zytoskelettären Komponenten erkennbar. Die Zentrosomen waren nicht mehr als Zeichen einer intakten MT-Synthese zu beobachten. Die beschriebenen Veränderungen entsprechen dabei am ehesten proteolytischen Reaktionen. Nach Barnard et al. führt eine höhere H_2O_2 -Konzentration, auf dem Boden oxidativer Zellschäden, zu einer PKC-unabhängigen Barrierestörung (4). Höhere H_2O_2 -Konzentrationen zeigten als Zeichen des irreversiblen Verlustes der Zellintegrität die Freisetzung von LDH und ^{51}Cr (110, 132, 142, 153, 155). In niedriger H_2O_2 -Konzentration können die Veränderungen der Endothelien noch reversibel sein, da zum einen keine erhöhte LDH-Freisetzung auf eine Zytolyse hinweist (4) und zum anderen über ein weitgehend intaktes MT- und F-Aktin-System zelluläre Reorganisationsmechanismen möglich erscheinen.

4.4 Kombinierte MT- und F-Aktinalteration durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin führen zu einer endothelialen Barrierestörung

Staphylococcus aureus α -Toxin ist ein porenbildendes Exotoxin, das von pathogenen Staphylokokkenstämmen sezerniert wird (31). Das Toxin wird als ein hydrophiles 3S Molekül freigesetzt. Nach Kontakt mit Zellmembran-Lipid-Bilayern führt die Bildung ringförmiger transmembranöser Kanäle zu einem Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen. Diese können Kaskaden von Signalwegen (u.a. den Arachidonsäure-Metabolismus) in Gang setzen. In hohen Dosen kann α -Toxin zur Zytolyse führen (120, 136, 140, 141). Das Toxin erhöhte rasch und potent die Permeabilität der Endothelzellmonolayer für Wasser und Albumin (136). Morphologisch zeigten sich nach der Stimulation mit α -Toxin dosisabhängige Mikrotubulus- und F-Aktin Veränderungen. In niedrigerer

Konzentration war ein leicht deformiertes MT-System mit betonten Zentrosomen festzustellen, welches auf eine MT-Störung mit aktiver Neusynthese hinwies. Morphologisch erschienen die Filamente wie „verklebt“. Das F-Aktin zeigte sich dabei verdichtet. Bei den Endothelzellen waren Zellretraktionen mit Ausbildung kleiner Zelllücken zu beobachten. Für die Befunde könnten die vorbeschriebenen MT-Veränderungen verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit konnten wir demonstrieren, dass MT-Schäden zu F-Aktinumverteilungen und Zellretraktionen mit Lücken-Bildung führen. Eine andere denkbare Ursache für mögliche Kontraktionen und die Zelllücken-Bildung nach α -Toxin-Gabe könnte der Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen sein (31, 136). Ca^{2+} würde in Gegenwart von Calmodulin zur Aktivierung der MLCK und zu auf Aktomyosin basierenden Kontraktionen führen (136). In höherer α -Toxin-Konzentration wurden deutliche destruktive Veränderungen der MT-Strukturen, der F-Aktin-Systeme sowie der EC-Monolayer beobachtet. Basierend auf dem mechanischen Ansatz dieser Arbeit und den Studien Ingbers lassen sich die Beobachtungen der höheren α -Toxin-Konzentration auch mechanisch erklären (56): Durch die fehlende Stabilisation sowohl der MT-Strukturen als auch der F-Aktin-Systeme kommt es zu einem Verlust der nach außen gerichteten Druckkräfte und zu einer Auflösung fokaler Adhäsionen. Dies führt konsekutiv zu schweren Zellformveränderungen mit großer Lückenbildung und Zellkollaps einzelner Endothelzellen mit massiver endothelialer Barrierestörung.

4.5 Tabellarischer Überblick

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen in bezug auf die Permeabilitätsdynamik und die Veränderung bzw. Schädigung der untersuchten zytoskelettären Filamentarten MT und F-Aktin. Weiterhin wird das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein des MT-Keimbildungszentrums (Zentrosom) dargestellt. Mit Ausnahme der MT-stabilisierenden Substanz Paclitaxel führten alle applizierten Substanzen zu einer

signifikanten Hyperpermeabilität. Bezüglich der Zunahme der Wasserflussrate zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen MT-depolymerisierenden Substanzen und F-Aktin-wirksamen Toxinen. Die Permeabilitätszunahme war bei direkter F-Aktinschädigung wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei MT-Depolymerisation. Die Zunahme der Wasserflussrate erfolgt dabei im Vergleich schneller und stärker. Die MT-Depolymerisation führte zu sekundären F-Aktinveränderungen (F-Aktin-Umverteilung, Stressfaser-, Zelllücken-Bildung) und folglich zu einer sekundären Barrierestörung mit Hyperpermeabilität. Die Zentrosomen waren dabei auch in höheren Toxinkonzentrationen erkennbar und eine MT-Neusynthese nach Beendigung der Toxinwirkung wahrscheinlich. Substanzen, die schädigend auf das F-Aktin wirken, aber zu keiner MT-Zerstörung führten (dementsprechend auch kein Zentrosomverlust), verdeutlichen einen möglichen Zusammenhang zwischen Zellschäden auf dem Boden von F-Aktinabbau, dem Vorhandensein von MT und Zentrosomen sowie der Möglichkeit zur Reversibilität der Ereignisse und Wiederherstellung des 3-dimensionalen Zytoskeletts. Cytochalasin D und Toxin B von *Clostridium difficile* führten zu einem massiven Abbau von F-Aktinstrukturen ohne MT- und Zentrosomverlust. Eine rasche Reversibilität der Barrierestörung ist für Cytochalasin D (15, 123) beschrieben worden und wurde auch in den Versuchen der vorgelegten Arbeit festgestellt. Die vielseitigen Zellfunktionen der Mikrotubulus-Systeme erlauben es möglicherweise den Endothelzellen, den durch massiven F-Aktinverlust entstandenen Zellschaden teils zu stabilisieren und sowohl die Regeneration von F-Aktin als auch die Wiederherstellung der Barrierefunktion einzuleiten. Schwerste Zellschäden waren bei den Wirkstoffen H_2O_2 und *Staphylococcus aureus* α -Toxin zu beobachten, bei denen es in höheren Konzentrationen zu einem kombinierten F-Aktin-, Mikrotubulus- und Zentrosom-Verlust kam. Hierbei zeigte sich ein schwerwiegender Stabilitätsverlust in den Zellformen mit zum Teil zellkollaptischer Ausprägung. Ferner waren Zentrosomen nicht mehr erkennbar und damit eine MT-Neusynthese eher unwahrscheinlich. Das Vorhandensein von Zentrosomen mit der Möglichkeit zur raschen Neusynthese funktionsfähiger Mikrotubulusfilamente scheint für die zelluläre Regenerations-

fähigkeit nach zelltoxischen Ereignissen unterschiedlicher Pathoäthiologie von wesentlicher Bedeutung zu sein.

<i>Substanz</i>	<i>30'</i>	<i>60'</i>	<i>120'</i>	<i>MT</i>	<i>Zentrosom Verlust</i>	<i>F-Aktin</i>
Colchicin 10⁻⁴ M	0,7	1,7	4,0	++	-	-/+
Vinca- Alkaloide 10⁻⁵ M	0,5	0,7	1,5	++	-	-/+
Paclitaxel 10⁻⁵ M	0,3	0,3	0,5	+/-	-	-
HNE 33 x 10⁶ PMN	2,8	5,0	>7,0	-	-	+
H₂O₂ 1mM	0,7	2,0	>5,0	+	+	+
TcdB- 10463 100 ng/ml	0,7	1,3	4,8	-	-	++
Cytoch.D 1 µg/ml	>9,0	./.	./.	-	-	++
α-Toxin (S.aureus) 40 µg/ml	6,0	6,2	6,0	+	+	+

Tabelle 1: Vergleich der Filtrationsrate ($y \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$) der verwendeten Substanzen nach 30, 60 und 120 Minuten in bezug auf Mikrotubulusschädigung, Zentrosomverlust und F-Aktin-Schäden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Zytoskeletts für die Regulation endothelialer Permeabilität untersucht. Dabei wurden insbesondere die Wirkung und Wechselwirkung von Mikrotubulus- und F-Aktinsystemen auf die Endothelbarriere und deren Morphologie betrachtet. Hierfür wurden Toxine eingesetzt, die direkt oder indirekt am Mikrotubulus- oder am Mikrofilamentsystem wirken (Colchicin, Vinca-Alkaloide, Paclitaxel, Cytochalasin D, Toxin B-10463 von *Clostridium difficile*, α -Toxin von *Staphylococcus aureus*, H_2O_2 , humane neutrophile Elastase). Als experimentelles Modell zur Permeabilitätsmessung dienten auf Polycarbonatfiltern gewachsene Endothelzellen, die unter einem hydrostatischen Druck von 10 cm Wassersäule den unterschiedlichen Substanzen ausgesetzt wurden. Die morphologischen Untersuchungen des endothelialen Zytoskeletts (MT, MF) erfolgten durch Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie. Ferner wurde der endotheliale intrazelluläre F-Aktin-Spiegel mittels TRITC-Phalloidin fluorometrisch quantifiziert. F-Aktin übt eine Hauptfunktion bei der Regulation der Endothelpermeabilität aus. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikrotubulus-Systeme in enger Verbindung mit F-Aktin stehen und einen wesentlichen Beitrag zur endothelialen Barrieresteuerung leisten. Die eingesetzten Mikrotubulus-Hemmer führten zeit- und dosisabhängig zu einer 5-10fachen Permeabilitäts-Zunahme. Morphologisch zeigten sich dabei Stressfaserbildungen, zelluläre F-Aktin-Umverteilungen und Zelllücken-Bildung. Ferner konnte eine Zunahme des intrazellulären F-Aktins nach MT-Depolymerisation gemessen werden. Die Stabilisierung der MT-Systeme durch den MT-Hemmer Paclitaxel führte zu keiner signifikanten Barrierefunktionsstörung. Die in der vorgelegten Arbeit erzielten Resultate verdeutlichen, dass MT-Systeme im Verbund mit F-Aktin fokale Adhäsionen formieren und stabilisieren. Ferner unterstreichen sie sowohl biochemische als auch mechanische Studien zum Thema Zellretraktion nach MT-Abbau. Die Depolymerisation von MT und die Freisetzung von MaPs führen zu einer Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden (GEF-H1-, Rho-, MLCK-Aktivierung) und konsekutiv zu einer erhöhten Zellkontraktilität (51,

65, 70, 159). Durch den Verlust der nach außen gerichteten MT-Stabilisation führen zusätzlich zelluläre und F-Aktin-assoziierte Zugkräfte zu Zellretraktionen und Zelllücken-Bildung. Die MT- und Zellmorphologie nach primärem F-Aktinabbau war Gegenstand weiterer Untersuchungen der vorgelegten Arbeit. Cytochalasin D und TcdB-10463 bewirken eine massive F-Aktinfragmentierung, die zu einer 10-20fachen Permeabilitätszunahme endothelialer Monolayer führte. Die Untersuchungen zeigten, dass MT-Systeme nach MF-Abbau intakt bleiben können. Darüber hinaus verdeutlichten diese Versuche, dass MT-Systeme mit F-Aktin interzelluläre Verbindungen bilden und zur Ausprägung und Aufrechterhaltung junctionaler Adhäsionsverbindungen beitragen. Somit sind MT-Systeme wesentlich an der Steuerung der Endothelbarriere beteiligt. Keine deutlichen, destruktiven MT- oder F-Aktinveränderungen zeigten dagegen granulozytäre Proteasen (HNE). Die 10-20fachen Zunahmen der endothelialen Wasserflussrate erklären sich dabei am ehesten durch eine morphologisch erkennbare massive Zelltonuszunahme mit ausgeprägter Stressfaser- und Zelllücken-Bildung. H₂O₂ führte zu einer 5-10fachen Zunahme der hydraulischen Konduktivität. Eine interendotheliale Lückenbildung mit deutlicher Stressfaser-Bildung zeigte niedrig dosiertes H₂O₂. MT- und MF blieben hierbei intakt. Als ursächlich werden intrazelluläre Signalwege mit Aktivierung der Proteinkinase C diskutiert (4). In höherer Dosierung zeigten sich im Rahmen oxidativer Zellschädigungen (4) sowohl beim MT- als auch beim F-Aktin-System erhebliche Destruktionen. Eine kombinierte destruktive Veränderung sowohl des MT- als auch des MF-Systems zeigte auch α -Toxin von *Staphylococcus aureus*, dessen Applikation zu einer 10-20fachen Permeabilitätszunahme der endothelialen Monolayer führte. Intrazelluläre Stabilitätsverluste und interzelluläre Bindungsverluste führten dabei zum Zellkollaps einzelner Endothelzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide zytoskelettären Komponenten, Mikrotubulus- und F-Aktin, in direkter Wechselwirkung stehen und zur Zellform und Stabilität und damit auch wesentlich zur Regulation der endothelialen Barrierefunktion beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.

Das Cytoskelett.

In: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie 2. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. 734-812 (2001)

2. Alexander, JS., Hechtmann, HB, Shepro, D.

Phalloidin enhances endothelial barrier function and reduces inflammatory permeability in vitro.

Microvasc Res 35: 308-315 (1988)

3. Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L., Levine, B.E.

Acute respiratory distress in adults.

Lancet 2: 319-323 (1967)

4. Barnard, J.W., Malik, A.B.

Control of endothelial permeability.

Intern. Soc. Heart Res.: 109-115 (1994)

5. Bashur, A.M., Fullerton, A.T., Hart, M.J., Bloom, G.S.

IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments.

J. Cell Biol. 13: 1555-1566 (1997)

6. Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., Geiger, B.

Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction.

Curr. Biol. 6: 1279-1289 (1996)

7. Bloom, G. S., Valle, R.B.

Association of microtubule-associated protein 2 (MAP 2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells.

J. Cell Biol. 96: 1523-1531 (1983)

8. Boge, T.C., Himes, R.H., Vander Velde, D.G., George, G.I.

The effect of the aromatic rings of taxol on biological activity and solution conformation: synthesis and evaluation of saturated taxol and taxotere analogues.

J. Med. Chem. 37: 3337-3343 (1994)

9. Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)

10. Bradley, J.R., Thiru, S., Pober, J.S.

Hydrogen peroxide-induced endothelial retraction is accompanied by a loss of the normal spatial organisation of endothelial cell adhesion molecules.

Am. J. Path. 147: 627-641 (1995)

11. Brenner, S.L., Korn, E.D.

The effects of cytochalasins on actin polymerisation and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerisation.

J. Biol. Chem. 255: 841-844 (1980)

12. Burridge, K.

Are stress fibers contractile?

Nature 294: 691-692 (1981)

13. Carlier, M.-F., Crique, P., Pantaloni, D., Korn, E.D.

Interaction of cytochalasin D with actin filaments in the presence of ADP and ATP.

J. Biol. Chem. 261: 2041-2050 (1986)

14. Cook, T.A., Nagasaki, T., Gundersen, G.G.

Rho guanosin triphosphatase mediates the selective stabilisation of microtubules induced by lysophosphatidic acid.

J. Cell Biol. 141: 175-185 (1998)

15. Cooper, J.A.

Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.

J. Cell Biol. 105: 1473-1478 (1987)

16. Cooper, J.A., Del Vecchio, P.J., Minnear, K.E., Burhop, K.E., Selig, W.M., Garcia, J.N., Malik, A.B.

Measurement of albumin permeability across endothelial monolayers in vitro.

J. Appl. Physiol. 62: 1076-1083 (1983)

17. Cronstein, B.N., Molad, Y., Reibmann, J., Balakhane, E., Levine, R.I., Weissmann, G.

Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils.

J. Clin. Invest. 96: 994-1002 (1995)

18. Cross, D., Vial, C., Maccioni, R.B.

A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines.

J. Cell Sci. 105: 51-60 (1993)

19. Danowski, B.A.

Fibroblast contractility and actin organisation are stimulated by microtubule inhibitors.
J. Cell Sci. 93: 255-266 (1989)

20. Dennerll, T.J., Joshi, H.C., Steel, V.L., Buxbaum, R.E., Heidemann, S.R.

Tension and compression in the cytoskeleton of PC-12 neurites II: quantitative measurements.
J. Cell Biol. 107: 665-674 (1988)

21. Drenckhahn, D., Ness, W.

The endothelial contractile cytoskeleton.
In: Vascular endothelium: Physiology, pathology, and therapeutic opportunities.
 Editors: Born, G.V.R., and C.V. Schwartz. F.K. Schattauer, Stuttgart, Germany.
 1-26 (1997)

22. Drenckhahn, D., Wagner, J.

Stressfibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix and contractility.
J. Cell Biol. 102: 1738-1747 (1986)

23. Enomoto, T.

Microtubule disruptions induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the Rho signal cascade.
Cell Struc. Func. 21: 317-326 (1996)

24. Ermert, L., Bruckner, H., Walmrath, D., Grimminger, F., Aktories, K., Suttorp, N., Duncker, H.R., Seeger, W.

Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs.
Am. J. Physiol. 268: L753-L761 (1995)

25. Estes, J.E., Selden, L.A., Gershman, L.C.

Mechanism of action of phalloidin on the polymerisation of muscle actin.
Biochem. 20: 708-712 (1981)

26. Estler, C.J.

Spindelgifte.
In: Pharmakologie und Toxikologie. Herausgeber: C.J. Estler., F.K. Schattauer, Stuttgart, Germany. 620-621 (1995)

27. Farrel, K.W., Wilson, L.

Proposed mechanism for colchicine poisoning of microtubules reassembled in vitro from *Strongylocentrotus purpuratus* sperm tail outer doublet tubulin.

Biochem. 19: 3048-3054 (1980)

28. Florin, I., Thelestam, M.

Lysosomal involvement in cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B.

Microb. Pathog. 1: 373-385 (1986)

29. Franke, R.P., Gräfe, M., Schnittler, H., Seiffge, D., Mittermayer, C.

Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress.

Nature 307: 648-649 (1984)

30. Füchtbauer, A.B., Jokusch, M., Maruta, H., Kiliman, M.W., Isenberg, G.

Disruption of microfilaments organisation after injection of F-actin capping proteins into living tissue cultured cells.

Nature 304: 361-364 (1983)

31. Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Trantumjensen, J., Kranz, T., Wellensiek, H-J.

On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* α -Toxin.

J. Cell Biol. 91: 83-94 (1981)

32. Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., Kaibuchi, K.

Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170

Cell 109:873-885 (2002)

33. Gail, M.H., Boone, C.W.

Effect of colcemid on fibroblast motility.

Exp. Cell res. 65: 221-227 (1971)

34. Garcia, J.G.N., Davis, H.W., Patterson, C.E.

Regulation of endothelial gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation.

J. Cell Physiol. 163: 510-522 (1995)

35. Gelfand, V. I., Bershadsky, A. D.

Microtubule dynamics: mechanism, regulation and function.

Annu. Rev. Cell Biol. 7: 93-116 (1991)

36. Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P.

Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmatic dynein.

J. Cell Biol. 115: 1639-1650 (1991)

37. Goeckenjan, G.

Erkrankungen der Atmungsorgane, Akutes Lungenversagen (ARDS).

In: Innere Medizin. Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, S. 543-547 (1999)

38. Goldblum, S.E., Ding, X., and J. Campbell-Washington.

TNF alpha induces endothelial cell F-actin depolymerisation, new actin synthesis, and barrier dysfunction.

Am. J. Physiol. 264: C894-C905 (1993)

39. Goldstein, L.S.B., Vale, R.D.

New cytoskeletal liasons.

Nature 359: 193-194 (1992)

40. Goode, B.L., Drubin, D.G., Barnes, G.

Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons.

Cell Biol. 12: 63-71 (2000)

41. Gottlieb, A.I., Lowell Langille, B., Wong, M.K.K., Kim, D.W.

Structure and function of endothelial cytoskeleton.

Lab. Invest. 65: 123-136 (1991)

42. Gozes, I., Barnstable, C.J.

Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin.

Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2579-2583 (1982)

43. Griffith, L. M., Pollard, T.D.

Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins.

J. Cell Biol. 78: 958-965 (1978)

44. Griffith, L. M., Pollard, T.D.

The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins.

J. Biol. Chem. 257: 9143-9151 (1982)

45. Gröschel-Stewart, U., Drenckhahn, D.

Muscular and cytoplasmic contractile proteins. Biochemistry, Immunology, structural organisation.

J. Collagen Rel. Res. 2: 381-463 (1982)

46. Gundersen, G.G., Khawaja, S., Bulinsky, J.C.

Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation.

J. Cell Biol. 109: 2275-2288 (1989)

47. Hall, A.

Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton.

Annu. Rev. Cell Biol. 10: 31-54 (1994)

48. Herman, B., Albertini, D.F.

A time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation.

J. Cell Biol. 98: 565-576 (1984)

49. Hinsberb, van, V.W.M., Nieuw Amerongen, van, G.P., Draijer, R.

Regulation of the permeability of human endothelial cell monolayers.

In: Vascular endothelium: Physiology, pathology, and therapeutic opportunities. Editors: Born, G.V.R., and C.V. Schwartz. F.K. Schattauer, Stuttgart, Germany. 61-76 (1997)

50. Hippenstiel, S.

Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) und des Phosphodiesterase-Isoenzym 2 für die Regulation der endothelialen Barriere in vitro.

Dissertationsschrift, Giessen 1998

51. Hippenstiel, S., Tannert-Otto, S., Vollrath, N., Krüll, M., Just, I., Aktories, K., von Eichel-Streiber, C., Suttorp, N.

Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function.

Am. J. Physiol. 272: L38-L43 (1997)

52. Hirokawa, N., Pfister, K.K., Yorifuji, H., Wagner, M.C., Brady, S.T., Bloom, G.S.

Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration.

Cell 56: 867-878 (1989)

53. Hitt, A.L., Cross, A.R., Williams, R.C.

Microtubule solutions display nematic liquid crystalline structure.

J. Biol. Chem. 265: 1639-1647 (1990)

54. Holzbauer, E.L.F., Hammarback, J.A., Paschal, B.M., Kravit, N.G., Pfister, K.K., Vallee, R.B.

Homology of a 150 K cytoplasmatic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene *Glued*.

Nature 351: 579-583 (1991)

55. Horwitz, S.B.

Mechanism of action of taxol.

Trends Pharm. Sci. 13: 134-136 (1992)

56. Ingber, D.E.

Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton.

J. Cell Sci. 104: 613-627 (1993)

57. Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., Narumiya, S.

Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1.

Nat. Cell Biol. 3: 8-14 (2001)

58. Jordan, M.A., Himes, R.H., Wilson, L.

Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro.

Cancer Res. 45:2741-2747 (1985)

59. Joshi, H.C., Chu, D., Buxbaum, R.E., Heidemann, S. R.

Tension and compression in the cytoskeleton of PC12 neurites.

J. Cell Biol. 101: 697-705 (1985)

60. Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M.R., Boquet, P., Hegenbarth, S., von Eichel-Streiber, C.

Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho.

J. Biol. Chem. 269: 10706-10712 (1994)

61. Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K.

Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B.

Nature 375: 500-503 (1995)

62. Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., Mc Conlogue, L.

Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes.

J. Cell Biol. 114: 725-733 (1991)

63. Kolodney, M.S., Elson, E.L.

Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10252-10256 (1995)

64. Korn, E.D.

Actin polymerisation and its regulation by proteins from nonmuscle cells.

Physiol. Rev. 62: 672-737 (1982)

65. Krendel, M., Zenke, F.T., Bokoch, G.M.

Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton.

Nature Cell Biol. 4: 294-301 (2002)

66. Kuipers, T.W., Raleigh, M., Kavanagh, T.

Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculo-tubular shape: a tubulin-driven process.

J. Immunol. 152: 5060-5069 (1994)

67. Langanger, G., Moeremans, M., Daneels, G., Sobieszek, A., De Brabander, M., De Mey, J.

The molecular organisation of myosin in stress fibers of cultured cells.

J. Cell Biol. 102: 200-209 (1986)

68. Lees-Miller, J.P., Helman, D.M., Schroer, T.A.

A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility.

Nature 359: 244-246 (1992)

69. Lewis, S.A., Cowan, N.

Microtubule bundling.

Nature 345: 674 (1990)

70. Liu, P.B., Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K.

Microtubule depolymerisation induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho.

Cell Adhes. Commun. 5: 249-255 (1998)

71. Liu, S.M., Magnusson, K.E., Sundqvist, T.

Microtubules are involved in transport of macromolecules by vesicles in cultured bovine aortic endothelial cells.

J. Cell Phys. 156: 311-316 (1993)

72. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J.

Mikrotubuli und Intermediärfilamente.

In: Molekulare Zellbiologie. Hrsg. d. Übersetzung: de Gruyter, W., 2. Auflage, Berlin, New York. 1079-1147 (1996)

73. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J.

Mikrofilamente: Zellbewegung und Zellgestalt.

In: Molekulare Zellbiologie. Hrsg. d. Übersetzung: de Gruyter, W., 2. Auflage, Berlin, New York. 1019-1076 (1996)

74. Lum, H., Malik, A.B.

Regulation of vascular endothelial barrier function.

Am. J. Physiol. 267: L223-L241 (1994)

75. Maccioni, R.B., Cambiazo, V.

Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly.

Am. Physiol. Soc. 75: 835-864 (1995)

76. Machesky, L.M., Hall, A.

Role of actin polymerisation and adhesion to extracellular matrix in rac- and rho-induced cytoskeletal reorganisation.

J. Cell Biol. 138: 913-926 (1997)

77. MacRae, T.H.

Towards an understanding of microtubule function and cell organisation: an overview.

Biochem. Cell Biol. 70: 835-841 (1992)

78. MacRae, T.H., Langdon, C.M.

Tubuline synthesis, structure and function: what are the relationships?

Biochem. Cell Biol. 67: 770-790 (1989)

79. Mareel, M.M., Storme, G.A., Bruyne, G.K., van Cauwenberge, R.M.

Vinblasine, Vincristine and Vindesine: anti-invasive effect on MO₄ mouse fibrosarcoma cells in vitro.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 199-210 (1982)

80. Matteoni, R., Kreis, E.

Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules.

J. Cell Biol. 105: 1253-1265 (1987)

81. McIntosh, J.R., Euteneuer, U.

Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle.

J. Cell. Biol. 98: 525-533 (1984)

82. McIntosh, J.R., Porter, M.E.

Enzymes for microtubule-dependent motility.

J. Biol. Chem. 264: 6001-6004 (1989)

83. Miller, R.H., Lasek, R.J.

Cross-bridges mediate anterograde and retrograde vesicle transport along microtubules in squid axoplasm.

J. Cell Biol. 101: 2181-2193 (1985)

84. Mitchison, T., Kirschner, M.

Dynamic instability of microtubule growth.

Nature 312: 237-242 (1984)

85. Mitchison, T., Kirschner, M.

Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes.

Nature 312: 232-237 (1984)

86. Nishida, E., Kuwaki, T., Sakai, H.

Phosphorylation of microtubule-associated proteins (MaPs) and pH of the medium control interaction between MaPs and actin filaments.

J. Biochem. 90: 575-578 (1981)

87. Oakley, C.E., Oakley, B.R.

Identification of γ -tubuline, a new member of the tubuline superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*.

Nature 338: 662-664 (1989)

88. Ohba, S., Kamata, K., Noumura, T.M.

Stabilisation of microtubules by dynein-binding in vitro. Stability of microtubule-dynein complex.

Biochim. Biophys. Acta 1158: 323-332 (1993)

89. Oksche, A., Nakov, R., Habermann, E.

Morphological and biochemical study of cytoskeletal changes in cultured cells after extracellular application of *Clostridium novyi* alpha-toxin.

Infect. Immun. 60: 3002-3006 (1992)

90. Olmsted, J.B.

Microtubule-associated Proteins.

Annu. Rev. Cell Biol. 2: 421-457 (1986)

91. Olmsted, J.B., Borisy, G.G.

Microtubules.

Annu. Rev. Biochem. 42: 507-534 (1973)

92. Pelham, H.R.B.

Green light for Golgi traffic.

Nature 389: 17-19 (1997)

93. Peterson, M.W., Stone, P., Shasby, D.M.

Cationic neutrophil proteins increase transendothelial albumin movement.

J. Appl. Physiol. 62: 1521-1530 (1987)

94. Pfister, K.K., Wagner, M.C., Stenoien, D.L., Brady, S.T., Bloom, G.S.

Monoclonal antibodies to kinesin heavy and light chains stain vesicle-like structures, but not microtubules, in cultured cells.

J. Cell Biol. 108: 1453-1463 (1989)

95. Pierre, P., Pepperkok, R. and Kreis, T.E.

Molecular characterisation of two functional domains of CLIP-170 in vivo.

J. Cell Sci. 107: 1909-1920 (1994)

96. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E., Kreis, T.E.

CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules.

Cell 70: 887-900 (1992)

97. Pletjushkina, O.J., Belkin, A.M., Ivanova, O.J., Oliver, T., Vasiliev, J.M., Jacobson, K.

Maturation of cell-substratum focal adhesions induced by depolymerization of microtubules is mediated by increased cortical tension.

Cell Adhes. Comm. 5: 121-135 (1996)

98. Pollard, T.D.

Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions.
Ann. Rev. Biochem. 55: 987-1035 (1986)

99. Pollard, T.D.

Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells.
J. Cell Biochem. 31: 87-95 (1986)

100. Pollard, T.D., Selden, S. C., Maupin, P.

Interaction of actin filaments with microtubules.
J. Cell Biol. 99: 33s-37s (1984)

101. Polley, M.

Bedeutung des Zytoskeletts für die Regulation der endothelialen Permeabilität.
Dissertationsschrift Gießen 1992

102. Preiß, J., Dornoff, W., Hagmann, F.-G., Schmieder, A.

Mammakarzinom.
In: Onkologie 2000, Empfehlung zur Therapie. 10. Auflage, Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saar-Pfalz-Mosel-E.V., Germany. 152-159 (2000)

103. Pytela, R., and G. Wiche.

High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4808-4812 (1980)

104. Ren Y., Li, R., Zheng, Y. Busch, H.

Cloning and characterisation of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases.
J. Biol. Chem. 273: 34954-34960 (1998)

105. Rinnerthaler, G., Geiger, B., Small, J.V.

Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membran ruffles and microtubules.
J. Cell Biol. 106: 747-760 (1988)

106. Ridley, A. J., Hall, A.

The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response of growth factors.
Cell 70: 389-399 (1992)

107. Rivera-Fillat, M.P., Pallare-Trujillo, J., Domenech, C., Grau-Oliete, M.R.

Comparative uptake, retention and action of vincristine, vinblastine and vindesine on murine leukaemic lymphoblasts sensitive and resistant to vincristine.

Br. J. Pharmacol. 93: 902-908 (1988)

108. Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., Tanaka, E., Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M., Gelfand, V.L.

Microtubule-dependent control of cell shape and pseudopodial activity is inhibited by the antibody to kinesin motor domain.

J. Cell Biol. 123: 1811-1820 (1993)

109. Root, R.K.

The adult respiratory distress syndrom.

West. J. Med. 150: 187-194 (1989)

110. Roth, P.

Wirkungsweise von H_2O_2 auf das Zytoskelett von pulmonalen Endothelzellen.

Dissertationsschrift (1997)

111. Rowinsky, E.K., Cazenave, L.A., Donehower, R.C.

Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent.

J. Natl Cancer Inst. 82: 1247-1259 (1990)

112. Rungger-Brändle, E., Gabbiani, G.

The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic processes.

Am. J. Path. 110: 361-392 (1983)

113. Sattillaro, R.F.

Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments.

Biochemistry 25: 2003-2009 (1986)

114. Schliwa, M.

Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks.

J. Cell Biol. 92: 79-91 (1982)

115. Schliwa, M., Blerkom, van, J.,

Structural interaction of cytoskeletal components.

J. Cell Biol. 90: 222-235 (1981)

116. Schnittler, H.J., Wilke, A., Gress, T., Suttorp, N., Drenckhahn, D.

Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium.

J. Physiol. 431: 379-401 (1990)

117. Schroeder, C.C., Fok, A.K., Allen, D.

Vesicle transport along microtubule ribbons and isolation of cytoplasmic dynein from *Paramecium*.

J. Cell Biol. 111: 2553-2562 (1990)

118. Schroer, T.A., Sheetz, M.P.

Two activators of microtubule-based vesicle transport.

J. Cell Biol. 115: 1309-1318 (1991)

119. Schuster, J., Brune, K., Estler, C.J.

Colchicin, Stoffeigenschaften und Pharmakodynamik.

In: Pharmakologie und Toxikologie. Herausgeber: C.J. Estler, F.K. Schattauer, Stuttgart, Germany. S. 522, (1995)

120. Seeger, W., Bauer, M., Bhakdi, S.

Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxan formation and the role of extracellular calcium.

J. Clin. Invest. 74: 849-858 (1984)

121. Seeger, W., Lasch, H.G.

Respiratorische Insuffizienz.

Internist 36: 318-326 (1995)

122. Selden, S.C., Pollard, T.D.

Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments.

J. Biol. Chem. 258: 7064-7071 (1983)

123. Seybold, J.

Das Zytoskelett der Endothelzelle: Regulation der Aktinfilamente unter dem Einfluss von bakteriellen Toxinen und Tumor-Nekrose-Faktor.

Dissertationsschrift (1994)

124. Shasby, D.M., Shasby, S., Sullivan, J.M., Peach, M.J.

Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability.

Circ. Res. 51: 657-661 (1982)

125. Sheridan, C.B., McIntyre, R.C., jr, Meldrum, D.R., Cleveland, J.C., jr, Agrafojo, J., Banerjee, A., Harken, A.H., Fullerton, D.A.

Microtubules regulate pulmonary vascular smooth muscle contraction.

J. Surg. Res. 62: 284-287 (1996)

126. Shu, W.P., Wang, D., Stracher, A.

Chemical evidence for the existence of activated G-Actin.

J. Biochem. 283: 567-573 (1992)

127. Smedly, L.A., Tonnesen, M.G., Sandhaus, R.A., Haslett, C., Guthrie, L.A., Johnses, R.B., jr., Henson, P.M., Worthen, G.S.

Neutrophil-mediated injury to endothelial cells.

J. Clin. Invest. 77: 1233-1243 (1986)

128. Solomon, F., Magendantz, M.

Cytochalasin separates microtubule disassembly from loss of asymmetric morphology.

J. cell Biol. 89: 157-161 (1981)

129. Song, Y., Wong, C., Chang, D.D.

Overexpression of wild-type RhoA produces growth arrest by disrupting actin cytoskeleton and mikrotubules.

J. Cell Biochem. 80: 229-240 (2000)

130. Stossel, T.P., Chapponier, C., Ezzel, R.M., Hartwig, J-H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., Yin, H.L., Zaner, K.S.

Nonmuscle actin-binding proteins.

Ann. Rev. Cell Biol. 1: 353-402 (1985)

131. Suprenant, K. A., Dentler, W.L.

Association between endocrine pancreatic secretory granules and in-vitro-assembled microtubules is dependent upon microtubule-associated proteins.

J. Cell Biol. 93: 164-174 (1982)

132. Suttorp, N.

Reaktive Sauerstoffmetabolite und pulmonale Sauerstofftoxizität.

Medwelt Vol. 35: 1513-1517 (1984)

133. Suttorp, N.

Zellbiologische Untersuchungen zur Pathogenese des akuten Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS).

Habilitationsschrift, Gießen 1988

134. Suttorp, N., Fuhrmann, M., Tannert-Otto, S., Grimminger, F., Bhakdi, S.

Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells.

J. Exp. Med. 178: 337-341 (1993)

135. Suttorp, N., Habben, E.

Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca^{2+} in polymorphonuclear leukocytes.

Infect. Immun. 56: 2228-2234 (1988)

136. Suttorp, N., Hessz, T., Seeger, W., Wilke, A., Koob, R., Lutz, F., Drenckhahn, D.

Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro.

Am. J. Physiol. 255: C368-C376 (1988)

137. Suttorp, N., Hippenstiel, S., Krüll, M., Seybold, J.

Modulation of endothelial permeability by cytoskeletal alterations and inhibition of specific phosphodiesterase-isoenzymes.

Intern. Soc. Heart Res.: 95-102 (1994)

138. Suttorp, N., Nolte, A., Wilke, A., Drenckhahn, D.

Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers.

Int. J. Microcirc. 13: 187-203 (1993)

139. Suttorp, N., Polley, M., Seybold, J., Schnittler, H.J., Seeger, W., Grimminger, F., Aktories, K.

Adenosine diphosphate-ribosylation of G-Actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability in vitro.

J. Clin. Invest. 87: 1575-1584 (1991)

140. Suttorp, N., Seeger, W., Dewein, E., Bhakdi, S., Roka, L.

Staphylococcal α -Toxin-induced PGI_2 production in endothelial cells: role of calcium.

Am. J. Physiol. 248: C127-C134 (1985)

141. Suttorp, N., Seeger, W., Zuckermann-Reimann, J., Roka, I., Bhakdi, S.

Mechanism of leukotriene generation in polymorphonuclear leukocytes by staphylococcal Alpha-Toxin.

Infect. Immun. 55: 104-110 (1987)

142. Suttorp, N., Simon, L.M.

Enhancement of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity in lung cells exposed to sustained in vitro hyperoxia.

J. Clin. Invest. 70: 342-350 (1982)

143. Suttorp, N., Weber, U., Welsch, T., Schudt, C.

Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro.

J. Clin. Invest. 91: 1421-1428 (1993)

144. Taylor, R.F., Price, T.H., Schwartz, S.M., Dale, D.C.

Neutrophil-endothelial cell interactions on endothelial monolayers grown on micropore filters.

J. Clin. Invest. 67: 584-587 (1981)

145. Vale, R.D., Goldstein, L.S.B.

One motor, many tails: an expanding repertoire of force-generating enzymes.

Cell 60: 883-885 (1990)

146. Vale, R.D., Hotani, H.

Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule-movement.

J. Cell Biol. 107: 2233-2241 (1988)

147. Vallee, R.B., Shpetner, H.S.

Motor proteins of cytoplasmatic microtubules.

Annu. Rev. Biochem. 59: 909-932 (1990)

148. Vallee, R.B., Wall, J.S., Paschal, B.M., Shpetner, H.S.

Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein.

Nature 332: 561-563 (1988)

149. Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Domnina, L.V., Ivanova, O.J., Komm, S.G., Olshevskaja, L.V.

Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts.

J. Embryol. Exp. Morph. 24: 625-640 (1970)

150. von Wichert, P.

Krankheiten des Lungenkreislaufs - Lungenödem, Lungenstauung.

In: Lehrbuch der inneren Medizin. Hrsg. Siegenthaler, W., Kaufmann, W., Hornbostel, H., Waller, H.D., Thieme Verlag Stuttgart: 3. Auflage, 166-167 (1992)

151. Verin, A., Birukova, A., Wang, P., Liu, F., Becker, P., Birukov, K., Garcia, J.G.N.

Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation.

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281: 565-574 (2001)

152. Voet, D., Voet, J. G.

Molekulare Physiologie, Cilienbewegung und Vesikeltransport.

In: Biochemie. Hrsg. Maelike, A. und W. Müller-Esterl. VCH Verlag, Weinheim, Germany. 1. Auflage 1151-1152 (1992)

153. Walmrath, D., Grimminger, F., Suttorp, N., Seeger, W.

Perspektiven in der Behandlung des Akuten Respiratorischen Distress-Syndroms (ARDS).

Med. Welt 45: 414-421 (1995)

154. Weber, U.

Die Rolle verschiedener Phosphodiesterase-Isoenzyme für die Regulation der endothelialen Permeabilität.

Dissertationsschrift Giessen 1998

155. Whorton, A.R., Montgomery, M.E., Kent, S.

Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells.

J. Clin Invest. 76: 295-302, (1985)

156. Wong, A.J., Pollard, T.D.

Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo.

Science 219: 867-869 (1983)

157. Wysolmerski, R.B., Lagunoff, D.

Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion.

Am. J. Pathol. 132: 28-37 (1988)

158. Wysolmerski, R.B., Lagunoff, D.

Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 16-20 (1990)

159. Zhang, D., Wang, Z., Jin, N., Li, L., Rhoades, R.A., Yancey, K.W., Swartz, D.R.

Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle.

J. Muscle Res. Cell Motil. 22: 193-200 (2001)

160. Zheng, Y., Jung, M.K., Oakley, B.R.

γ -Tubuline is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome.

Cell 65: 817-823 (1991)

161. Zigmond, S.H.

Signal transduction and actin filament organization.

Curr. Opin. Cell Biol. 8: 66-73 (1996)

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Norbert Suttorp für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas und die hervorragende Betreuung innerhalb seiner Arbeitsgemeinschaft.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Dr. Stefan Hippenstiel danken, dessen Erfahrungen und wissenschaftliches Denken zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Ferner gilt mein Dank Frau Dipl.-Ing. Susanne Tannert- Otto. Sie lehrte mich Zellen zu kultivieren und präzise zu arbeiten. Dabei strahlte sie im Laborbetrieb eine so wohltuende Ruhe aus.

Isabel Thiel danke ich herzlich für ihre wertvolle Hilfe und große Geduld. Ebenso danke ich auch Carolin Reger für ihre freundlichen Korrekturarbeiten.

Ganz besonders herzlichen Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Horst und Elisabeth, meinen Schwestern Iris und Dorothea, meiner Patentante Marianne und meiner Oma Erna Mühle. Ohne diese liebevolle und auch materielle Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit viel schwerer geworden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hans-Werner Mühle
geboren am	04. September 1962 in Bochum
Familienstand	ledig

Schulbildung

1969 - 1973	Gemeinschafts-Grundschule in Bochum
1973 - 1982	Lessing-Gymnasium in Bochum
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1982 - 1983	Pflegehelfer an der Klinik für Innere Medizin in der Augusta-Kranken-Anstalt in Bochum
-------------	---

Berufsausbildung/-tätigkeit

1984 - 1987	Ausbildung zum Tischlergesellen bei der Trommer KG in Witten
1987 - 1989	Studium der Architektur an der Fachhochschule Bochum
1982 - 1992	Beteiligung als Bassmusiker in Musikprojekten

Studium der Humanmedizin

04/1993 -05/ 2000	Justus-Liebig-Universität, Gießen 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 05. 2000
04/1999-03/2000	Praktisches Jahr / Med. Klinik II des Klinikums Wetzlar-Braunfels, Chir. Abt. des Gondar College of Medical Sciences in Gondar / Äthiopien, Urol. Klinik des Klinikums Wetzlar-Braunfels

Arzt im Praktikum

07/2000 - 12/2001	Medizinische Klinik II des Klinikums Wetzlar- Braunfels
01/2001 - 12/2001	Innere Abteilung des KKH Schotten-Gedern
Assistenzarzt	
03/2001 - 08/2002	Innere Abteilung des KKH Alsfeld, Dozent für Innere Medizin der Krankenpflegeschule Alsfeld, Notarzdienst der Rettungsleitstelle Alsfeld
01/2003 - 08/2003	Röntgenabteilung des Krankenhaus Haderslev
09/2003 -	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Krankenhaus Haderslev / Dänemark

Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre hiermit, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.